

08/211312

11 Rec'd PCT/PTO 01 APR 1994

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION: Agnes LABIGNE, et al.

INTERNATIONAL  
APPLICATION NO: PCT/FR92/00921

INTERNATIONAL  
FILING DATE: 2 October 1992

FOR: *HELICOBACTER PYLORI* GENES NECESSARY FOR THE REGULATION AND  
MATURATION OF UREASE, AND USE THEREOF.

REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 USC 119,  
THE INTERNATIONAL CONVENTION AND THE  
PATENT COOPERATION TREATY

Honorable Commissioner of Patents and Trademarks  
Washington, D.C. 20231

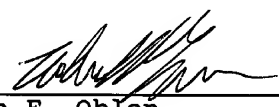
Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the Applicant claims as a priority date 3 October 1991, the filing date of the corresponding Convention Application filed in France. The corresponding Convention Application bears Serial Number 91/12198.

The Certified Copy of the corresponding Convention Application was submitted to the International Bureau in PCT Application Number PCT/FR92/00921 filed on 2 October 1992. Receipt of the certified copy by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.

  
\_\_\_\_\_  
Norman F. Oblon  
Attorney of Record  
Registration No. 24,618  
Robert F. Gnuse  
Registration Number 27,295

Fourth Floor  
1755 S. Jefferson Davis Highway  
Arlington, Virginia 22202  
660-075-0X PCT  
/jlb

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

11 REC'D PCT/PTO 26 APR 1993

INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PRIORITY DOCUMENT

REC'D 09 NOV 1992

WIPO PCT

# BREVETS D'INVENTION

## CERTIFICATS D'UTILITÉ - CERTIFICATS D'ADDITION

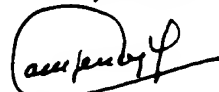
### Copie officielle

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme, d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris le 16 OCT. 1992

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle

Le Chef de Division



Yves CAMPENON



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

PCT/FR 92/00924

**DUPLICATA  
DE LA REQUÊTE**

**DEMANDE DE  
(voir case cochée)**

DATE DE REMISE DES PIÈCES

03/10/91

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

91 12198 -

DATE DE DÉPÔT

03 OCT. 1991

CODE POSTAL DU LIEU DE DÉPÔT

75

4 DATE DU POUVOIR GÉNÉRAL

25/03/1987 (INSERM)

5 RÉFÉRENCE DU CORRESPONDANT

B1738 AD

6 TÉLÉPHONE DU CORRESPONDANT

47-42-82-82

7 TITRE DE L'INVENTION

NOUVEAUX GENES D'HELICOBACTER PYLORI. LEUR UTILISATION POUR LA PRÉPARATION DE SOUCHES RECOMBINANTES DE H. PYLORI.

8 DEMANDEUR(S) : Nom et Prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination et forme juridique

INSTITUT PASTEUR  
Fondation privée reconnue d'utilité publique

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE  
Établissement public

N° SIREN. LE CAS ÉCHÉANT

9 ADRESSE(S) COMPLÈTE(S)

25-28, rue du Dr. Roux  
75724 PARIS CEDEX 15 (FRANCE)  
101, rue de Tolbiac  
75654 PARIS CEDEX 13 (FRANCE)

PAYS

FRANCE

10 NATIONALITÉ(S)

FRANÇAISE

11 INVENTEUR(S)

LE DEMANDEUR EST L'UNIQUE INVENTEUR

☐ OUI

Si la réponse est non voir notice explicative

☒ NON

12

SI LE DEMANDEUR EST UNE PERSONNE PHYSIQUE NON IMPOSABLE, IL REQUIERT OU A REQUIS LA RÉDUCTION DES REDEVANCES

☐ OUI

☐ NON

DE DÉPÔT

REDEVANCES VERSÉES

D'AVIS DOCUMENTAIRE

DE REVENDICATION DE PRIORITÉ

DE REVENDICATION (à partir de la 1<sup>re</sup>)

13 DÉCLARATION DE PRIORITÉ

PAYS ORIGINE

DATE DE DÉPÔT

NUMÉRO

14

DIVISIONS

ANTÉRIEURES À LA PRÉSENTE DEMANDE

N°

N°

N°

N°

15 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE  
NOM ET QUALITÉ DU SIGNATAIRE

DEBAIL Anne

ERNEST GUTMANN/YVES PLASSERAUD S.A.

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

Cocher la case choisie

LES ENCADRÉS GRAS SONT RÉSERVÉS À L'ADMINISTRATION

91 12198

CLASSIFICATION INTERNATIONALE DES BREVETS

Int. Cl 5

Ne pas tenir  
compte de  
ces chiffres



C12N 15/31 , 15/44 , 1/21 ,  
C12Q 1/68 ,  
C12P 21/05 ,  
H61K 39/02

## DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

## DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

N° d'enregistrement national

9112198

## Titre de l'invention :

NOUVEAUX GENES D'HELICOBACTER PYLORI. LEUR UTILISATION POUR LA PREPARATION  
DE SOUCHES RECOMBINANTES DE H. PYLORI.

## Le (s) soussigné (s)

ERNEST GUTMANN - YVES  
PLASSERAUD S.A.  
67, Boulevard Haussmann  
75008 PARIS (FRANCE)

## désigne (nt) en tant qu'inventeur (s) (nom, prénoms, adresse)

LABIGNE Agnès  
47, avenue Beau-Séjour  
91440 Bures sur Yvette  
FRANCE

CUSSAC Valerie  
59, rue D'Avron  
75020 PARIS  
FRANCE

FERRERO Richard  
154, rue de Vaugirard  
75015 PARIS  
FRANCE

Date et 13 Janvier 1992

signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

DESAIX Anne

# DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDICATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
63, 64			X	19/11/91	25 NOV. 1991 C J

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article 28 du décret du 19 septembre 1979, est signalé par la mention "R.M." (revendications modifiées).



Nouveaux gènes d'*Helicobacter pylori*. Leur utilisation pour la préparation de souches recombinantes de *H. pylori*.

*Helicobacter pylori* (désigné également par l'expression *H. pylori*) est une bactérie à gram négatif retrouvée exclusivement à ce jour à la surface de la muqueuse de la partie antrale de l'estomac chez l'homme, et plus particulièrement autour des lésions des cratères des ulcères gastriques et duodénaux. Cette bactérie était initialement appelée *Campylobacter pyloridis* (Warren et al (1983) Lancet 1. 1273-1275).

Comme la plupart des bactéries, *H. pylori* est sensible à un milieu de pH acide mais cependant peut tolérer l'acidité en présence de taux physiologiques d'urée (Marshall et al (1990) Gastroenterol. 99: 697-702). En hydrolysant l'urée sous forme de dioxyde de carbone et d'ammoniac qui sont relargués dans le microenvironnement de la bactérie, l'uréase de *H. pylori* est supposée permettre la survie de la bactérie dans l'environnement acide de l'estomac. Récemment des études menées sur des modèles animaux ont fourni des éléments suggérant que l'uréase est un facteur important dans la colonisation de la muqueuse gastrique (Eaton et al (1991) Infect. Immun. 59: 2470-2475). L'uréase est également suspectée de causer des dommages soit directement, soit indirectement, à la muqueuse gastrique.

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) est à l'heure actuelle reconnu comme l'agent étiologique des gastrites antrales, et apparaît comme un des cofacteurs requis pour le développement des ulcères. Par ailleurs il semble que le développement de carcinomes gastriques puisse être associé à la présence de *H. pylori*.

Toutes les souches isolées en clinique à partir des biopsies ou de jus gastrique synthétisent une uréase très active, exposée en surface de la bactérie, qui est l'une des protéines les plus immunogènes de H. pylori. L'uréase est suspectée de jouer un rôle dans le processus pathogénique, un fait qui a été confirmé par les expérimentations réalisées sur le porc montrant que des souches faiblement productrices d'uréase obtenues par mutagenèse chimique, étaient incapables de coloniser l'estomac du porc. Ces résultats obtenus après mutagenèse chimique ne permettent cependant pas d'attribuer de façon certaine, la diminution de la production d'uréase à une inaptitude à coloniser l'estomac, d'autres gènes ayant pu être inactivés lors de la mutagenèse généralisée. Il ne s'agit donc pas de mutations contrôlables et par conséquent cette technique ne présente pas d'intérêt réel dans la conception de moyens destinés à diminuer, voire prévenir les effets néfastes de l'uréase dans le cas d'une infection par H. pylori .

Outre ce rôle dans la colonisation de l'estomac, il a été montré que l'uréase ainsi que l'ammoniac libérée pourraient avoir un effet cytotoxique direct sur les cellules épithéliales et un effet indirect en induisant une réponse inflammatoire qui serait à l'origine des lésions gastriques.

L'uréase est donc l'un des déterminants de pathogénicité les plus importants, et la construction de souches isogéniques de H. pylori inactivées spécifiquement dans les gènes responsables de l'expression de l'uréase, qu'il s'agisse des gènes de structures ou des gènes accessoires, sont de première importance pour préciser le rôle de l'uréase dans l'étape de colonisation, et pour une application à la

construction de souches utilisables pour protéger les individus dans un processus de vaccination, par exemple par la construction de souches atténuées.

Jusqu'à présent les gènes de l'uréase avaient été localisés sur un fragment de 34 kb du chromosome de H. pylori et avaient été associés à une région de 4,2 kb présente dans ce fragment. Quatre gènes désignés par les termes ureA, ureB, ureC et ureD avaient été associés à cette région de 4,2 kb. Cette région permettait d'obtenir un phénotype uréase-positif lorsque l'ADN de 4,2 kb était transféré par l'intermédiaire d'un vecteur navette dans Campylobacter jejuni.

Cependant la transformation de cellules de E.coli avec l'ADN de 4,2 kb précédemment décrit ne permettait pas d'obtenir l'expression d'une activité uréasique dans E.coli.

Les inventeurs ont réussi à déterminer quels sont les éléments, tant du point de vue génétique que du point des conditions de culture, nécessaires pour l'expression dans E.coli d'une activité uréasique telle qu'obtenue chez H. pylori. Ils ont à cet égard déterminé que l'expression de l'uréase chez E.coli était dépendante à la fois de l'activation du système de régulation de l'azote de E.coli et de la présence de gènes accessoires des gènes structuraux de l'uréase. Ils ont identifié et isolé plusieurs gènes que l'on désignera parfois dans la suite par l'expression "gènes accessoires" de l'uréase, qui permettent l'expression fonctionnelle de l'uréase chez E.coli et déterminent la maturation et la régulation de l'uréase chez H. pylori.

L'invention concerne donc un ensemble de cinq nouveaux gènes déterminants ou au moins susceptibles d'intervenir dans l'expression fonctionnelle de

l'uréase chez H. pylori et chez E.coli, ainsi que chacun de ces gènes considérés isolément et indépendamment des autres gènes. Elle vise également cet ensemble de gènes, le cas échéant modifiés, en association avec les gènes de structure désignés par ureA, ureB, ureC et ureD de l'uréase et décrits dans la publication (Labigne et al (1991) J. Bacteriol 173: 1920-1931).

L'invention vise par ailleurs de nouveaux moyens de détection in vitro d'une infection par H. pylori, ainsi que des compositions utilisables pour la protection contre l'infection par H. pylori.

L'invention a donc pour objet une séquence nucléotidique, caractérisée en ce qu'elle est constituée par ou en ce qu'elle comprend au moins une des séquences nucléiques correspondant aux gènes appelés ureE, ureF, ureG, ureH, ureI et répondant aux enchaînements nucléotidiques présentés à la figure 4 ci-dessous :

1 A CTC TTT AGC ATT TTC TAG GA TTT TTT AGG AGC AAC GCT CTT AGA TCC TTA GTT TTT AGC  
 --leu phe ser ile phe AMB  
 61 TCT CTG ATT TTT TGT TTA TCA AAA AAT TGG GGG CTT TTT TTG TTT TTA TTT TTT GTC AAT  
 91  
 121 TTA CTA TTT TTC TTT ATG ATT AGC TCA AGC AAC AAA AGT TAT TCG TAA GGT GCG TTT GTT  
 151  
 181 GTA AAA ATT TTT GGT TGG AAG GAA AAG GCA ATG CTA GGA CTT GTA TTG TTA TAT GTT GGG  
 Met leu gly leu val leu leu tyr val gly  
 ureI  
 211  
 241 ATT GTT TTA ATC AGC AAT GGG ATT TGC GGG TTA ACC AAA GTC GAT CCT AAA AGC ACT GCG  
 ile val leu ile ser asn gly ile cys gly leu thr lys val asp pro lys ser thr ala  
 271  
 301 GTG ATG AAC TTT TTT GTG GGT GGG CTC TCC ATT ATT TGT AAT GTG GTT GTC ATC ACT TAT  
 val met asn phe phe val gly gly leu ser ile ile cys asn val val val ile thr tyr  
 331  
 361 TCC GCT CTC AAC CCT ACA GCC CCT GTA GAA GGT GGT GAA GAT AAT GGT CAA GTA TCA CAC  
 ser ala leu asn pro thr ala pro val glu gly ala glu asp ile ala gln val ser his  
 391  
 421 CAT TTG ACT AAT TTC TAT GGG CCA GCG ACT GGG TTA TTG TTT GGT TTC ACC TAC TTG TAT  
 his leu thr asn phe tyr gly pro ala thr gly leu leu phe gly phe thr tyr leu tyr  
 451

511  
 481 GCG GCT ATC AAC CAC ACT TTT GGT TTG GAT TGG AGG CCC TAC TCT TGG TAT AGC TTA TTC  
 ala ala ile asn his thr phe gly leu asp trp arg pro tyr ser trp tyr ser leu phe

571  
 541 GTA GCG ATC AAC ACG ATT CCT GCT GCG ATT TTA TCC CAC TAT AGC GAT ATG CTT GAT GAC  
 val ala ile asn thr ile pro ala ala ile leu ser his tyr ser asp met leu asp asp

631  
 601 CAC AAA GTG TTA GGC ATC ACT GAA GGC GAT TGG TGG GCG ATC ATT TGG TTG GCT TGG GGT  
 his lys val leu gly ile thr glu gly asp trp trp ala ile ile trp leu ala trp gly

691  
 661 GTT TTG TGG CTT ACC GCT TTC ATT GAA AAC ATC TTG AAA ATC CCT TTA GGG AAA TTC ACT  
 val leu trp leu thr ala phe ile glu asn ile leu lys ile pro leu gly lys phe thr

751  
 721 CCA TGG CTT GCT ATC ATT GAG GGC ATT TTA ACC GCT TGG ATC CCT GCT TTA CTC TTT  
 pro trp leu ala ile ile glu gly ile leu thr ala trp ile pro ala trp leu leu phe

811  
 781 ATC CAA CAC TGG GTG TGA GAT GAT CAT  
 ile gln his trp val opa

812  
 782 TCC AAC ACT GGG TGT GAG ATG ATC ATA GAG CGT TTA ATA GGC AAT CTA AGG GAT TTA AAC  
 urea Met ile ile glu arg leu ile gly asn leu arg asp leu asn

842 CCC TTG GAT TTC AGC GTG GAT TAT GTG GAT TTG GAA TGG TTT GAA ACG AGG AAA AAA ATC  
 pro leu asp phe ser val asp tyr val asp leu glu trp phe glu thr arg lys lys ile  
 871  
 902 GCT CGC TTT AAA ACC AGG CAA GGC AAA GAC ATA GCC GTA CGC CTT AAA GAC GCT CCC AAG  
 ala arg phe lys thr arg gln gly lys asp ile ala val arg leu lys asp ala pro lys  
 932  
 962 TTG GGT TTC TCT CAA GGA GAT ATT TTA TTT AAA GAA GAG AAG GAA ATT ATC GCC GTT AAT  
 leu gly phe ser gln gly asp ile leu phe lys phe lys glu lys glu ile ala val asn  
 992  
 1022 ATC TTG GAT TCT GAA GTC ATT CAC ATC CAA GCT AAG AGC GTG GCA GAA GTA GCG AAA ATA  
 ile leu asp ser glu val ile his ile gln ala lys ser val ala glu val ala lys ile  
 1052  
 1082 TGC TAT GAA ATA GGA AAC CGC CAT GCG GCT TTA TAC TAT GGC GAG TCT CAA TTT GAA TTT  
 cys tyr glu ile gly asn arg his ala ala leu tyr tyr gly glu ser gln phe glu phe  
 1112  
 1142 AAA ACA CCA TTT GAA AAG CCC ACG CTA GCG TTA CTA GAA AAG CTA GGG GTT CAA AAT CGT  
 lys thr pro phe glu lys pro thr leu ala leu leu lys leu gly val glu asn arg  
 1172  
 1202 GTT TTA AGT TCA AAA TTG GAT TCC AAA GAA CGC TTA ACC GTG AGC ATG CCC CAT AGT GAG  
 val leu ser ser lys leu asp ser lys glu arg leu thr val ser met pro his ser glu  
 1232

	1292	SD
1262	CCT AAT TTT AAG GTC TCA CTG GCG AGC GAT TTT AAA GTG GTC ATG AAA TAG AAA AAC AA	
	pro asn phe lys val ser leu ala ser asp phe lys val val met lys AMB	
1321	CAA ATG GAT AAA GGA AAA AGC GTG AAA AGC GTG GGT ATG CTC CCA AAA	
F	Met asp lys gly lys ser val lys ser ile glu lys ser val gly met leu pro lys	
1381	ACT CCA AAG ACA GAC AGC AAT GCT CAT GTG GAT AAT GAA TTT CTG ATT CTG CAA GTC AAT	
	thr pro lys thr asp ser asn ala his val asp asn glu phe leu ile leu gln val asn	
1441	GAT GCG GTG TTC CCC ATT GGA TCT TAC ACG CAT TCT TTT GGG CTT TTG GCT AGA AAC TTA	
	asp ala val phe pro ile gly ser tyr thr his ser phe gly leu leu ala arg asn leu	
1501	CAT CCA GCA AAA AAG GTT ACT AAT AAA GAA AGC GCT TTA AAA TAT TTA AAA GCC AAT CTC	
	his pro ala lys lys val thr asn lys glu ser ala leu lys tyr leu lys ala asn leu	
1561	TCT AGC CAG TTC CTT TAC ACG GAA ATG CTG AGC TTG AAA CTC ACC TAT GAA AGC GCT CTC	
	ser ser gln phe leu tyr thr glu met leu ser leu lys leu thr tyr glu ser ala leu	
1621	CAA CAA GAT TTA AAA AGG ATC TTA GGG GTT GAA GAA ATC ATT ACG CTA TCC ACA AGC CCC	
	gln gln asp leu lys arg ile leu gly val glu glu ile ile thr leu ser thr ser pro	



1681  
 ATG GAA TTG CGA TTA GCC AAT CAA AAG CTA GGC AAT CGT TTC ATT AAA ACC TTA CAA GCC  
 met glu leu arg leu ala asn glu lys leu gly asn arg phe ile lys thr leu gln ala  
 1711

1741  
 ATG AAC GAA TTA GAC AAT GGC GCA TTT TTT AAC GCT TAC GCT CAA CAA ACC GAA GAC CCC  
 met asn glu leu asp ile gly ala phe phe asn ala tyr ala gln gln thr glu asp pro  
 1771

1801  
 ACC CAT GCC ACT AGC TAT GGC GTT TTT GCG GCG AGT TTG GGG AAT GAA TTG AAA AAG GCT  
 thr his ala thr ser tyr gly val phe ala ala ser leu gly ile glu leu lys lys ala  
 1831

1861  
 TTA AGG CAT TAT CTT TAT GCA CAA ACT TCT AAC ATG GTA ATT AAC TGC GTT AAA AGC GTC  
 leu arg his tyr leu tyr ala gln thr ser asn met val ile asn cys val lys ser val  
 1891

1921  
 CCA CTA TCT CAA AAC GAT GGT GGC CAA AAA ATC TTA TTG AGC TTG CAA AGC CCT TTT AAC CAG  
 pro leu ser glu asn asp gly glu lys ile leu leu ser leu gln ser pro phe asn gln  
 1951

1981  
 CTC ATA GAA AAA ACC CTA GAA CTA GAC GAA AGC CAC TTG TGC GCG GCA AGC GTT CAA AAC  
 leu ile glu lys thr leu glu leu asp glu ser his leu cys ala ala ser val gln asn  
 2011

2041  
 GAC ATT AAG GCG ATG CAG CAT GAG AGT TTA TAC TCG CGC CTT TAT ATG TCT TGA ATT TTA  
 asp ile lys ala met gln his glu ser leu tyr ser arg leu tyr met ser opa  
 2071

2102 SD 2132  
 TCT CAA ATT GAA AGG AAT TTT ATG GTA AAA ATT GGA GTT TGT GGT CCT GTA GGA AGC GGT  
ureG Met val lys ile gly val cys gly pro val gly ser gly  
 2162 2192  
 AAA ACC GCC TTG ATT GAA GCT TTA ACG CGC CAC ATG TCA AAA GAT TAT GAC ATG GCG GTC  
lys thr ala leu ile glu ala leu thr arg his met ser lys asp tyr asp met ala val  
 2222 2252  
 ATC ACT AAT GAT ATT TAC ACG AAA GAA GAC GCA GAA TTT ATG TGT AAA AAT TCG GTG ATG  
 ile thr asn asp ile tyr thr lys glu asp ala glu phe met cys lys asn ser val met  
 2282 2312  
 CCA CGA GAG AGG ATC ATT GGC GTA GAA ACA GGA GGC TGT CCG CAC ACG GCT ATT AGA GAA  
 pro arg glu arg ile ile gly val glu thr gly gly cys pro his thr ala ile arg glu  
 2342 2372  
 GAC GCT TCT ATG AAT TTA GAA GCC GTA GAA GAA ATG CAT GGC CGT TTC CCT AAT TTG GAA  
 asp ala ser met asn leu glu ala val glu met his gly arg phe pro asn leu glu  
 2402 2432  
 TTG CTT TTG ATT GAA AGC GGA GGC AGT AAC CTT TCA GCG ACT TTC AAC CCA GAG CTA GCG  
 leu leu leu ile glu ser gly gly ser asn leu ser ala thr phe asn pro glu leu ala  
 2462 2492  
 GAC TTT ACG ATC TTT GTG ATT GAT GTG GCT GAG GGC GAT AAA ATC CCC AGA AAA GGC GGG  
 asp phe thr ile phe val ile asp val ala glu gly asp lys ile pro arg lys gly gly

2821  
AAG CTC ATG GCG CCC TTT TAC CCT AAA GAC GAT TTA GCG GAA ATC ATG CTT TTA GCG GTA  
lys leu met ala pro phe tyr pro lys asp asp leu ala glu ile met leu leu ala val

2881 2911  
 AGC CCT GGC TTA ATG AAA GGC GAT GCA CAA GAT GTG CAA TTG AAC ATC GGT CCA AAT TGC  
 ser pro gly leu met lys gly asp ala gln asp val gln leu asn ile gly pro asn cys

2941 2971  
 AAG TTA AGG ATC ACT TCG CAA TCC TTT GAA AAA ATC CAT AAC ACT GAA GAC GGG TTT GCT  
 lys leu arg ile thr ser gln ser phe glu lys ile his asn thr glu asp gly phe ala

3001 3031  
 AGC AGA GAC ATG CAT ATC GTT GTG GGG GAA AAC GCT TTT TTA GAC TTC GCG CCC TTC CCG  
 ser arg asp met his ile val val gly glu asn ala phe leu asp phe ala pro phe pro

3061 3091  
 TTA ATC CCC TTT GAA AAC GCG CAT TTT AAG GGC AAT ACC ACG ATT TCT TTG CCG TCT AGC  
 leu ile pro phe glu asn ala his phe lys gly asn thr thr ile ser leu arg ser ser

3121 3151  
 TCC CAA TTG CTC TAT AGT GAA ATC ATC GTC GCA GGG CGA GTG GCG AAT GAG TTG TTT  
 ser gln leu leu tyr ser glu ile ile val ala gly arg val ala arg asn glu leu phe

3181 3211  
 AAA TTC AAC CGC TTG CAC ACC AAA ATC TCT ATT TTA CAA GAT GAG AAA CCC ATC TAT TAT  
 lys phe asn arg leu leu his thr lys ile ser ile leu glu asp glu lys pro ile tyr tyr

3241 3271  
 GAC AAC ACG ATT TTA GAT CCC AAA ACC ACC GAC TTA AAT AAC ATG TGC ATG TTT GAT GGC  
 asp asn thr ile leu asp pro lys thr thr asn asn met cys met phe asp gly

3341  
TAC CCT TTA GTC TTT TTT AA

ou, toute partie d'au moins une de ces séquences nucléiques.

Une séquence nucléotidique selon l'invention est constituée soit par de l'ADN, soit par de l'ARN.

L'invention concerne aussi une séquence nucléotidique modifiée par rapport à la séquence nucléotidique décrite ci-dessus, par délétion, addition, substitution ou inversion d'un ou plusieurs nucléotides, de telle façon que les propriétés fonctionnelles des polypeptides codés par ces gènes modifiés sont soit conservées soit atténuées, voire supprimées, par rapport aux propriétés des polypeptides UreE, UreF, UreG, UreH ou UreI tels qu'exprimés par H. pylori, ou de telle façon que cette séquence n'exprime pas de polypeptide chez H. pylori.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention et dans le cadre de la définition précédente, une séquence nucléotidique est caractérisée en ce qu'elle constituée par, ou en ce qu'elle comprend :

- a) l'ensemble des séquences nucléiques correspondant aux gènes appelés ureE, ureF, ureG, ureH, ureI et répondant aux enchaînements nucléotidiques présentés à la figure 4 ou,
- b) l'ensemble formé par les séquences nucléiques (variantes) correspondant à ces gènes modifiés indépendamment les uns des autres, de telle façon que l'ensemble de ces variantes code pour des polypeptides ayant une homologie fonctionnelle avec les polypeptides UreE, UreF, UreG, UreH ou UreI tels qu'exprimés par H.pylori, ou au contraire code pour des polypeptides modifiés, pour atténuer voire supprimer les propriétés

fonctionnelles des polypeptides UreE, UreF, UreG, UreH ou UreI tels qu'exprimés par H. pylori ou.

Des fragments des séquences nucléotidiques ci-dessus sont intéressants pour différentes raisons et à titre d'exemple on peut définir :

- des fragments des susdites séquences, ayant conservé la capacité de coder pour des polypeptides ayant une homologie fonctionnelle avec les polypeptides tels qu'obtenus par expression d'un gène choisi parmi ureE, ureF, ureG ou ureI, dans H. pylori ;
- des fragments codant pour toute partie des polypeptides ci-dessus tels qu'obtenus chez H. pylori, et en particulier codant pour des peptides ou des parties de polypeptides reconnus par des anticorps dirigés contre H. pylori ou capables de se comporter comme des haptènes ou des immunogènes ;
- des fragments des susdites séquences dépourvus de la capacité de coder pour les polypeptides de H. pylori tels qu'exprimés à partir des gènes ureE, ureF, ureG, ureH ou ureI ;
- des fragments codant pour des polypeptides ou peptides ayant des propriétés atténuées, voire supprimées par rapport aux propriétés des polypeptides codés par les gènes ureE, ureF, ureG, ureH ou ureI de H. pylori.

Ces gènes ureE, ureF, ureG, ureH et ureI, est présent sur un chromosome de H. pylori; ces gènes sont des gènes dits accessoires par rapport aux gènes de structure de l'uréase (ureA, ureB). Par opposition aux gènes de structure, les gènes accessoires ne sont pas nécessaires à la formation de l'enzyme uréase. En revanche ils interviennent dans l'expression

fonctionnelle de l'uréase telle qu'exprimée chez H. pylori, par des moyens de régulation et/ou de maturation de l'uréase formée. L'uréase est en effet exprimée sous la forme d'une apoenzyme inactive avant de subir une étape de maturation au sein de H. pylori, étape qui lui confère sa forme d'enzyme fonctionnelle.

Les inventeurs ont par ailleurs constaté que la présence de ces cinq gènes accessoires est indispensable à l'expression de l'uréase fonctionnelle dans des cellules de E.coli préalablement transformées avec les gènes de structure ureA, ureB, ureC et ureD.

En conséquence l'identification de ces gènes et de leurs séquences nucléotidiques, permet d'envisager des moyens pour moduler l'activité uréasique dans des souches de H. pylori en particulier pour préparer des souches atténuées.

Selon un premier mode de réalisation de l'invention, des séquences nucléotidiques intéressantes codent pour des polypeptides ayant une homologie fonctionnelle avec les polypeptides UreE, UreF, UreG, UreH et UreI naturels. Cette homologie entre des polypeptides, est appréciée par rapport à la capacité de ces polypeptides, de fonctionner au sein de H. pylori, comme les polypeptides UreE, UreF, UreG, UreH et UreI naturels et par conséquent de contribuer à la formation de l'uréase fonctionnelle à partir de l'apoenzyme.

Cette homologie fonctionnelle peut être détectée par la mise en oeuvre du test suivant :  $10^9$  bactéries sont resuspendues dans 1 ml de milieu urée-indole et incubées à 37°C. L'hydrolyse de l'urée conduit à la libération d'ammoniaque, qui en augmentant le pH, induit un changement de coloration de orange à rouge fushia.



Au contraire on peut mettre en oeuvre dans le cadre de l'invention, des séquences nucléotidiques, répondant à l'ensemble des séquences nucléiques correspondant aux gènes ureE, ureF, ureG, ureH ou ureI, ces séquences étant modifiées de façon à ce que les polypeptides pour lesquels elles codent ne possèdent plus la capacité des polypeptides naturels de permettre la production d'une uréase fonctionnelle dans H. pylori ou le cas échéant dans une autre espèce. Dans ce cas on cherche à atténuer ou à supprimer les propriétés fonctionnelles des polypeptides naturels, tels qu'exprimés par H. pylori. On considère que les propriétés fonctionnelles sont atténuées lorsque la souche dans laquelle les séquences nucléotidiques selon l'invention sont insérées, produit une uréase non pathogène par exemple sous la forme d'une apoenzyme. Cette pathogénicité peut être évaluée par la mise en oeuvre du test suivant :

On teste l'implantation dans l'estomac d'un animal, de préférence le porcelet gnotobiotique, de la souche recombinante, en utilisant la technique décrite par Eaton et al (1991 Infect. Immun. 59: 2470-2475).

Selon un premier mode de réalisation de l'invention, une séquence nucléotidique telle que définie précédemment peut être associée aux séquences nucléiques correspondant aux gènes de structure ureA et ureB codant pour les sous-unités uréasiques chez H. pylori.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, cette séquence nucléotidique est associée aux gènes ureA, ureB, ureC et/ou ureD codant pour l'uréase chez H. pylori.

Dans ce cas les différents gènes peuvent être localisés sur des réplicons distincts.

L'invention concerne également les séquences nucléotidiques entrant dans le cadre de la définition précédente et répondant à l'un des enchaînements nucléotidiques codant correspondant aux gènes ureE, ureF, ureG, ureH ou ureI. A cet égard l'invention vise en particulier les enchaînements suivants :

- l'enchaînement ureE correspondant aux nucléotides 800 à 1309 de la séquence de la figure 4, ou tout fragment de cet enchaînement dès lors qu'il hybride dans des conditions stringentes c'est à dire à 68°C dans 6 x SSC milieu de Denhard ou à 37°C dans 5 x SSC 50% Formamide avec l'enchaînement ureE ou avec la séquence complémentaire à cet enchaînement,
- l'enchaînement ureF correspondant aux nucléotides 1324 à 2091 de la séquence de la figure 4, ou tout fragment de cet enchaînement dès lors qu'il hybride dans des conditions stringentes c'est à dire à 68°C dans 6 x SSC milieu de Denhard ou à 37°C dans 5 x SSC 50% Formamide avec l'enchaînement ureF ou avec la séquence complémentaire à cet enchaînement,
- l'enchaînement ureG correspondant aux nucléotides 2123 à 2719 de la séquence de la figure 4, ou tout fragment de cet enchaînement dès lors qu'il hybride dans des conditions stringentes c'est à dire à 68°C dans 6 x SSC milieu de Denhard ou à 37°C dans 5 x SSC 50% Formamide avec l'enchaînement ureG ou avec la séquence complémentaire à cet enchaînement,
- l'enchaînement ureH correspondant aux nucléotides 2722 à 3516 de la séquence de la figure 4, ou tout fragment de cet enchaînement dès lors qu'il hybride dans des conditions stringentes

c'est à dire à 68°C dans 6 x SSC milieu de Denhard ou à 37°C dans 5 x SSC 50% Formamide avec l'enchaînement ureH ou avec la séquence complémentaire à cet enchaînement,

- l'enchaînement ureI correspondant aux nucléotides 211 à 795 de la séquence de la figure 4, ou tout fragment de cet enchaînement dès lors qu'il hybride dans des conditions stringentes c'est à dire à 68°C dans 6 x SSC milieu de Denhard ou à 37°C dans 5 x SSC 50% Formamide avec l'enchaînement ureI ou avec la séquence complémentaire à cet enchaînement.

On appelle ici "séquences complémentaires" en ce qui concerne les séquences d'ADN, des séquences inverses et complémentaires. Le terme "inverse" rend compte de la restauration de l'orientation 5'-3' de l'acide nucléique, complémentaire par la nature des nucléotides et ce par rapport à une séquence donnée.

L'invention vise aussi un enchaînement nucléotidique particulier répondant à la séquence suivante :

GCG AAA ATA TGC TAT GAA ATA GGA AAC CGC CAT

L'invention se rapporte également à toute séquence d'ADN qui comprend cet enchaînement nucléotidique.

Les séquences nucléotidiques selon l'invention répondant aux définitions précédentes peuvent entrer dans la constitution de sondes, lorsqu'elles sont marquées, par exemple à leur extrémité 5' et/ou 3', par une substance que l'on peut détecter. A titre de marqueur on peut citer les isotopes radioactifs, les enzymes, les marqueurs chimiques ou chimioluminescents, les fluorochromes, les haptènes ou les anticorps, des analogues de base ou encore des marqueurs physiques. Ces marqueurs peuvent le cas échéant être fixés à un

support solide par exemple un support particulaire ou membranaire, comme des billes magnétiques.

A titre de marqueur préféré, on peut citer le phosphore radioactif ( $^{32}\text{p}$ ) incorporé à l'extrémité 5' de la séquence utilisée comme sonde.

Avantageusement une sonde nucléotidique selon l'invention comprend tout fragment des gènes décrits, par exemple des fragments d'environ 45 nucléotides.

Des sondes préférées selon l'invention sont constituées par des fragments issus des gènes ureH ou ureI.

A partir des séquences nucléotidiques selon l'invention, on peut aussi définir des amorces (primers) utilisables pour la détection in vitro d'une infection par H. pylori. Une amorce est caractérisée en ce qu'elle comprend un fragment nucléotidique tel qu'issu d'une séquence décrite précédemment, comprenant d'environ 18 à environ 30 de préférence d'environ 25 à environ 30 nucléotides. Une telle amorce peut être mise en oeuvre dans des réactions d'amplification génique, par exemple selon une technique de polymérisation en chaîne.

Pour l'utilisation dans une technique d'amplification, des amorces de l'invention sont prises en combinaison deux à deux, de façon à hybrider dans des conditions déterminées avec les extrémités 5' et 3' respectives du fragment nucléotidique à amplifier.

Si l'on met en oeuvre la technique PCR, les conditions requises pour l'hybridation spécifique des amorces avec l'ADN à détecter sont les conditions décrites dans les demandes EP 200363, 201184, 229701 et la température est calculée selon la formule

$$T (^{\circ}\text{C}) = [4(\text{C} + \text{G}) + 2(\text{A} + \text{T}) - 10]$$

dans laquelle A, T, C, G représentent le nombre de nucléotides A, T, C, G dans les amorces utilisées.

Les techniques d'amplification utilisables dans le cadre de l'invention comportent par exemple la technique PCR (Polymerase Chain Reaction) décrite dans les demandes de brevet européen de Cetus (n° 200363, 201184 et 229701), ou encore la technique de "Q $\beta$  Replicase" décrite dans Biotechnology (Vol. 6, Octobre 1988).

D'autres séquences nucléotidiques selon l'invention sont des séquences hybridant dans des conditions stringentes telles que définies ci-dessus avec une séquence définie dans les pages précédentes ou une séquence complémentaire de ces séquences.

Les séquences nucléotidiques et les vecteurs de l'invention peuvent aussi être utilisés pour l'expression d'autres gènes ou séquences de H. pylori ou d'autres souches dans H. pylori ou dans d'autres hôtes comme E.coli, l'Adenovirus.

L'invention vise en outre un polypeptide caractérisé en ce qu'il correspond à l'un des polypeptides UreE, UreF, UreG, UreH ou UreI présentés à la figure 4, à toute partie d'au moins un de ces polypeptides. L'invention vise en particulier tout polypeptide modifié dès lors qu'il présente une homologie fonctionnelle avec le polypeptide d'origine UreE, UreF, UreG, UreH ou UreI tel qu'exprimé par H. pylori, ou au contraire modifié par délétion, addition, substitution ou inversion d'un ou plusieurs acides aminés, pour atténuer voire supprimer ses propriétés fonctionnelles s'agissant de l'activité uréasique telle qu'exprimée par H. pylori.

Les polypeptides UreE, UreF, UreG, UreH et UreI interviennent notamment dans la régulation et la maturation de l'uréase chez H. pylori.

Un autre polypeptide selon l'invention est celui qui répond à l'enchaînement de 11 acides aminés suivant :

Ala Lys Ile Cys Tyr Glu Ile Gly Asn Arg His

Les polypeptides de l'invention et en particulier le polypeptide dont la séquence est donnée ci-dessus, peuvent être utilisés pour la production d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux, ou pour la détection d'anticorps dans un échantillon biologique infecté par H. pylori.

Des anticorps monoclonaux peuvent être préparés par la technique des hybridomes ou par les techniques connues pour préparer des anticorps humains.

Des anticorps contre l'enchaînement de 11 acides aminés ci-dessus pourraient être mis en oeuvre dans le cadre d'une réaction de blocage de la maturation de l'uréase.

L'invention a également pour objet des vecteurs recombinants caractérisés en ce qu'ils contiennent une séquence d'ADN de l'invention. De tels vecteurs recombinants peuvent par exemple être des cosmides ou des plasmides.

Un vecteur particulièrement avantageux pour la réalisation de l'invention est caractérisé en ce qu'il s'agit du plasmide pILL753 contenu dans E.coli HB101 déposé à la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Paris France) le 3 Octobre 1991 sous le numéro I-1148.

Un autre vecteur recombinant particulièrement avantageux est caractérisé en ce qu'il s'agit du

plasmide pILL763 contenu dans E.coli HB101 déposé à la CNCM le 3 Octobre 1991 sous le numéro I-1149.

L'invention a aussi pour objet un hôte cellulaire recombinant (ou souche cellulaire recombinante), caractérisé en ce qu'il est transformé par une séquence nucléotidique répondant aux définitions précédemment données. Cet hôte cellulaire ainsi transformé doit permettre l'expression de la séquence nucléotidique des gènes accessoires de l'uréase, le cas échéant modifiés conformément aux définitions précédentes.

A titre préféré, un hôte cellulaire recombinant est une souche de H. pylori modifiée par une des séquences nucléotidiques précédemment définies, et de façon avantageuse modifiée de telle façon que les produits des gènes accessoires modifiés qu'elle exprime, contribuent à atténuer les effets de l'uréase, en particulier ses effets pathogènes.

Par exemple une telle souche recombinante peut être obtenue par mutation de la souche N6 de H. pylori déposée à la CNCM le 3 Octobre 1991 sous le numéro I-1150, la mutation étant effectuée au niveau de l'un au moins des gènes ureE, ureF, ureG, ureH ou ureI, et/ou au niveau d'un ou plusieurs des gènes de structure, par exemple ureA ou ureB.

De préférence on formera dans le cadre de l'invention, des souches recombinantes et en particulier des souches de H. pylori recombinantes dont l'activité uréasique est atténuée conformément aux critères déterminés précédemment.

Ainsi des souches N6 recombinantes particulièrement avantageuses sont celles qui permettent d'obtenir un phénotype uréase-négatif et comportent au moins un des gènes ureE, ureF, ureG, ureH ou ureI muté.

Une inactivation du gène ureI permet par exemple de préparer des souches H. pylori uréase-négatives. De même certaines mutations au sein de ureI permettent d'obtenir un phénotype uréase-négatif chez H. pylori, alors que les produits des gènes ureA et ureB sont exprimés. Il s'agit par exemple de la mutation n°8 décrite dans les exemples.

On peut cependant transformer d'autres souches avec les séquences de l'invention. En particulier on aura recours à E.coli pour réaliser des mutations dans les gènes ureE, ureF, ureG, ureH ou ureI, préalablement insérés dans cette souche, par exemple par l'intermédiaire d'un plasmide. Les gènes ainsi mutés peuvent ensuite être introduits dans une autre cellule hôte, par exemple dans H. pylori.

On note que la délétion du gène ureI dans une cellule E.coli recombinante selon l'invention n'altère pas le phénotype uréase-positif dès lors que les autres conditions pour l'expression de ce phénotype sont réunies.

La souche E.coli recombinante peut par ailleurs être utilisée pour produire les polypeptides UreE, UreF, UreG, UreH ou UreI et les purifier par les techniques classiques.

Les souches recombinantes de H. pylori, à activité uréase atténuée, peuvent être également utilisées pour le transport et l'expression de gènes hétérologues, par exemple des gènes du choléra ou des salmonelles

Différentes techniques peuvent être employées pour réaliser des souches recombinantes. On aura par exemple recours à la technique d'électroporation telle que décrite dans les exemples de cette demande.

Le cas échéant cette technique d'électroporation peut être modifiée en supprimant l'étape consistant à



effectuer un choc électrique au niveau des cellules à transformer.

L'invention propose des moyens pour protéger contre une infection par H. pylori et en particulier par l'administration de compositions immunogènes contenant une souche cellulaire recombinante caractérisée par une activité uréasique atténuée. De telles compositions immunogènes peuvent être utilisées en médecine humaine.

Une composition immunogène peut contenir des souches telles que des cellules de H. pylori dont l'activité uréasique est atténuée par insertion dans la souche d'une séquence nucléotidique selon l'invention, comportant au moins une séquence correspondant aux gènes ureE, ureF, ureG, ureH ou ureI, le cas échéant modifiés pour diminuer l'activité uréasique.

Il peut s'agir de façon générale de tout hôte capable de produire une uréase atténuée, par exemple par mutation des séquences nucléotidiques d'un ou plusieurs gènes ureA, ureB, ureC, ureD, ureE, ureF, ureG, ureH ou ureI ou par expression d'une forme tronquée d'un polypeptide intervenant dans la structure, la maturation ou la régulation de l'uréase.

L'invention a aussi pour objet un kit pour le diagnostic in vitro d'une infection par H. pylori sur un échantillon biologique déterminé, caractérisé en ce qu'il comprend :

- au moins un couple d'amorces nucléotidiques répondant aux critères ci-dessus, capables d'hybrider aux extrémités 5' et en 3' d'un fragment nucléotidique spécifique d'au moins une séquence nucléique correspondant à un gène choisi parmi ureE, ureF, ureG, ureH ou ureI,

- des réactifs nécessaires à l'extraction des acides nucléiques à partir de l'échantillon traité,
- des réactifs pour effectuer la polymérisation dudit fragment nucléotidique, à partir des amorces nucléotidiques, notamment des enzymes de polymérisation, en quantité suffisante pour réaliser l'amplification du fragment que l'on souhaite amplifier,
- au moins un enchaînement de nucléotides pouvant être utilisé comme sonde et capable d'hybrider dans des conditions déterminées avec le fragment d'ADN amplifié,
- le cas échéant des moyens pour révéler l'hybridation.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, on peut également incorporer au kit,

- un contrôle interne de la réaction d'amplification par exemple constitué par un acide nucléique éventuellement porté par un plasmide, ledit acide nucléique pouvant aisément être détecté par hybridation, par exemple du fait qu'il contient un gène de résistance à un antibiotique, ou du fait qu'il est constitué par de l'ADN chromosomique de N6, ledit fragment étant en outre muni à ces deux extrémités d'au moins une amorce d'amplification, ces amorces étant ou non choisies parmi les amorces de l'invention, et
- une sonde capable d'hybrider avec l'acide nucléique contenu dans le contrôle interne,
- le cas échéant, une reverse transcriptase pour obtenir de l'ADNc à partir de l'ARN éventuellement présent dans l'échantillon testé.

La présence d'un contrôle interne ajouté à l'échantillon permet de détecter la présence de "faux négatifs" parmi les échantillons. En effet, lorsque la sonde spécifique du contrôle interne ne détecte pas un produit d'amplification, on est vraisemblablement en présence d'un échantillon contenant un inhibiteur de la Tag polymérase, inhibiteur qui gêne l'amplification d'ADN ou d'ADNc de H. pylori. Dans ce cas, différentes dilutions de l'échantillon testé peuvent permettre de mettre en évidence la présence d'acide nucléique de H. pylori.

Lorsque le témoin interne présente une réaction positive, une réaction négative au niveau de l'échantillon testé permet de déduire qu'il y a bien absence de H. pylori.

On note que les amorces incorporées au contrôle interne, ne sont pas nécessairement celles de l'invention. Cependant, le choix d'autres amorces peut entraîner une diminution de sensibilité.

A titre d'exemple d'échantillon biologique pour la détection d'une infection chez l'homme par H. pylori, on utilisera des prélèvements tels que des biopsies, du jus gastrique ou éventuellement de la salive.

Ce kit peut aussi être mis en oeuvre pour des contrôles de pollution des eaux ou des contrôles sur des aliments.

L'invention se rapporte aussi à un procédé pour le diagnostic in vitro d'une infection par H. pylori, dans un échantillon biologique déterminé, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de :

- a) mise en contact de l'acide nucléique de l'échantillon susceptible de contenir H. pylori dans des conditions permettant l'accessibilité sous forme d'ADN simple brin ou d'ARN, avec au

moins un couple d'amorces nucléotidiques selon l'invention, lesdites amorces pouvant hybrider avec l'acide nucléique de H. pylori s'il est présent, et initier la synthèse du produit d'élongation desdites amorces, chaque brin de séquence nucléotidique de H. pylori servant de matrice lorsqu'il est apparié avec les amorces;

b) séparation des brins d'acide nucléique synthétisés, de leur matrice;

c) répétition de la synthèse du produit d'élongation, à partir de chaque brin d'acide nucléique présent à l'issue de l'étape b) et susceptible d'hybrider avec les amorces, jusqu'à l'obtention d'une amplification de l'acide nucléique recherché, suffisante pour être détectée,

d) mise en contact du produit de l'étape c) avec une sonde nucléotidique dans des conditions permettant de détecter la présence de l'acide nucléique amplifié recherché;

e) détection des produits de l'hybridation éventuellement formés.

Selon un mode de réalisation préféré du procédé pour le diagnostic in vitro ci-dessus défini, la mise en contact de l'échantillon testé est précédée d'une étape de traitement de l'échantillon de façon à en extraire l'acide nucléique.

Selon un autre mode de réalisation préféré, le procédé comporte une étape préalable à la mise en contact avec les amorces consistant en un traitement de l'acide nucléique de l'échantillon avec une reverse transcriptase, pour obtenir la synthèse d'ADNc à partir de l'ARN éventuellement présent dans l'échantillon testé.

L'invention vise aussi un kit pour le diagnostic in vitro d'une infection par H. pylori caractérisé en ce qu'il comprend :

- une quantité déterminée de sondes selon la définition précédente,
- un milieu approprié pour la réalisation d'une réaction d'hybridation entre l'acide nucléique de H. pylori à détecter et la sonde,
- des réactifs pour la détection des hybrides éventuellement formés.

Un procédé pour l'utilisation de ce kit et pour le diagnostic in vitro d'une infection par H. pylori, à partir d'un échantillon biologique, est caractérisé en ce qu'il comprend :

- la mise en contact de l'échantillon à tester dont l'ADN et/ou de l'ARN a été préalablement rendu accessible, avec une sonde précédemment définie, dans des conditions permettant l'hybridation de l'acide nucléique avec la sonde;
- la mise en évidence d'une réaction d'hybridation éventuelle entre l'acide nucléique et la sonde.

Les séquences nucléotidiques de l'invention peuvent être obtenues soit par extraction de l'acide nucléique de H. pylori et digestion avec des endonucléases choisies et purification, ou encore par synthèse chimique.

A titre d'exemple, on peut citer pour la synthèse de tels fragments d'acides nucléiques, la méthode au phosphotriester, telle que décrite par Narang, S.A. et al dans Meth. of Enzymol., 68, 90 (1979). Une autre méthode adaptée pour la préparation de fragments de nucléotides est la méthode au phosphotriester telle que décrite par Brown E.L. et al, dans dans Meth. of Enzymol., 68, 109 (1979).

Cette préparation peut également être effectuée par un processus automatisé, par exemple faisant intervenir les diethylphosphoramidites en tant que constituants de départ, et dans ce cas, la synthèse peut être réalisée suivant la description de Beaucage et al, Tetrahedron Letters (1981), 22, 1859-1862.

D'autres avantages et propriétés de l'invention apparaissent dans les exemples qui suivent et dans les figures.

FIGURES

Figure 1: Sous-clonage et mutagénèse par transposon de pILL753

A : Carte de restriction linéaire du cosmide hybride pILL585 et du plasmide pILL590 (Labigne et al - 1991). Les cadres gris représentent le fragment d'ADN requis pour l'expression de l'uréase dans C. jejuni.

B : Insertion au hasard du transposon MiniTn3-Km. Les nombres (1 à 24) de même que les cercles, correspondant au site d'insertion du transposon dans pILL753; les signes (+) indiquent que le transposon n'a pas inactivé l'expression de l'uréase alors que les signes (-) indiquent que l'expression de l'uréase a été abolie.

C : Carte de restriction linéaire des plasmides hybrides pILL763 et pILL768 générés par délétion ( $\Delta$ ) à l'intérieur de pILL753. La localisation des gènes (ureA à ureH) est indiquée par des rectangles. La longueur des rectangles correspond à la longueur de l'ADN requis pour exprimer les polypeptides. Les flèches se réfèrent à l'orientation de la transcription. Le nombre de cadres en bas de la figure indique la taille en kilobases des fragments de restriction. Les nombres entre parenthèse correspondent à la taille des fragments d'ADN de H. pylori insérés dans un des vecteurs de clonage (pILL575, pILL550 ou pILL570). B, BamHI; E, EcoRI, P, PstI, H, HindIII; C, ClaI; Sm, SmaI. Les lettres entre parenthèse indiquent que les sites de restriction appartiennent au vecteur.

**Figure 2: Activité uréasique exprimée par E.coli HB101 hébergeant pILL753, en fonction du temps**

Des boîtes préparées avec soit un milieu L-agar (ML) soit un milieu minimum M9 complétées avec 10 mM L-arginine (MM) ont été chacune inoculées avec une partie aliquote de 100  $\mu$ l de culture et mises en suspension ( $10^8$  bactérie/ml) dans du NaCl stérile, à 0,85%. Les boîtes ont été incubées, en milieu aérobie ou microaérobie, à (A) 30°C ou (B) 37°C et les mesures de l'activité ont été faites en temps voulu. Les astérisques indiquent qu'aucune activité uréasique n'a été détectée.

**Figure 3: Séquence d'ADN des gènes accessoires de l'uréase de H. pylori**

**A :** Stratégie pour le séquençage des gènes accessoires de la région uréase du plasmide hybride pILL753. Les flèches correspondent aux tailles des fragments d'ADN séquencés. Les têtes de flèches représentent les oligonucléotides utilisés pour réaliser et confirmer la détermination oligonucléotidique.

**B :** Représentation schématique des cinq cadres ouverts de lecture (ORFs) déduits à partir de l'analyse de la séquence nucléotidique et leurs tailles en nucléotides. ATG correspond au codon d'initiation relatif à chacun des gènes.

**C :** Les tailles et les masses moléculaires calculées des cinq polypeptides supplémentaires de l'uréase de H. pylori sont indiquées.



**Figure 4: Séquence nucléotidique des gènes accessoires de l'uréase de H. pylori**

Les nombres en haut de la séquence indiquent la position des nucléotides. Les séquences d'acides aminés prédites, dans l'ordre séquentiel sont : UreI (bp 211 à 795), UreE (bp 800 à 1309), UreF (bp 1324 à 2091), UreG (bp 2123 à 2719), et UreH (bp 2722 à 3516). Les séquences potentielles de liaison aux ribosomes (Shine-Dalgarno, sites SD), sont soulignées. Les séquences encadrées correspondent aux séquences de type promoteur-like (σ70 et σ54) et les flèches au dessus de la séquence indiquent les structures en boucle avec les éléments d'un signal de fin de transcription rho-indépendant (Rosenberg et al (1979) Annu. Rev. Genet. 13: 319-359). Les pointillés sous la séquence d'acides aminés correspondent au domaine de liaison de l'ADN ou de l'ATP de la protéine (Higgins et al (1985) EMBO J. 4: 1033-1040 et Pabo et al (1984) Ann. Rev. Biochem. 53: 293-321).

**Figure 5: Organisation génétique de l'opéron uréase**

Les positions relatives des gènes codant pour des polypeptides associés avec l'opéron uréase de P. mirabilis (Jones et al (1989) J. Bacteriol. 171: 6414-6422), de K. aerogenes (Mulrooney et al - 1990) et de H. pylori (Labigne et al - 1991) sont indiqués. Les pourcentages se rapportent à la proportion d'acides aminés identiques entre deux gènes apparentés. Les cadres blancs représentent les gènes qui sont uniques à l'opéron.

**Figures 6 et 7 Analyse des souches parentales et mutées**

**Figure 8: Profils de restriction après digestion enzymatique des ADN totaux**

**Figure 9 Profils de restriction des souches 85P et N6**

**Figure 10 Produits d'amplification des gènes**

**Figure 11 Immunobuvardage à l'aide d'anticorps**

**Figure 12 Mutagenèse par transposon : Représentation schématique de quatre étapes de conjugaisons consécutives nécessaires pour la construction de mutants dans une bactérie H. pylori**

Conjugaison 1 : le plasmide transférable pOX38 du groupe IncF hébergeant le transposon MiniTn3-Km est introduit dans E.coli HB 101 contenant 1) le plasmide pTCA exprimant de façon constitutive la transposase Tn3 (TnpA) et immun à TN3 compte tenu de la présence de la séquence Tn3-38bp et 2) le vecteur suicide de conjugaison contenant le fragment cloné de H. pylori à mutagénéiser. Les transconjugants HB101 kanamycine sont cultivés pendant 48 heures à 30°C et les bactéries sont conjuguées avec E.coli DH1 (Nal).

Conjugaison 2 : les cointégrats résultant de la transposition de MiniTn3-Km dans le plasmide dérivé de pILL570 en l'absence de résolvase sont sélectionnés comme cointégrats kanamycine conjugatifs dans les cellules DH1.

Conjugaison 3 : les cointégrats sont introduits dans la souche NS2114 (Rif) hébergeant le gène cre, capable de produire une résolution par recombinaison spécifique du cointégrat en deux réplicons, l'un consistant dans

le donneur d'origine pour le transposon (pOX38-MiniTn3-Km) et l'autre consistant dans le plasmide hydride dérivant de pILL570 dans lequel MiniTn3-Km a été inséré. La sélection positive des formes résolues des cointégrats a été obtenue par sélection des transconjugants NS2114 à la kanamycine, sur un milieu contenant 300 µg/ml de kanamycine ainsi que 300 µg/ml de spectinomycine. La dernière conjugaison entre E.coli et une souche déterminée par exemple H. pylori peut être réalisée selon la description de Labigne-Roussel et al, 1988 précitée.

**Figure 13 Carte de restriction de MiniTn3 selon Seifert et al (1986 précité)**

L'étoile indique dans le plasmide pILL570 le site de restriction qui a été modifié selon ce qui a été décrit.

## I - IDENTIFICATION DES GENES

### MATERIELS ET METHODES

#### Souches bactériennes, plasmides et conditions de culture

H. pylori 85P a été isolé chez un patient atteint de gastrite, et correspond à la souche décrite dans Labigne et al (J. Bacteriol. 173: 1920-1931 (1991)). E.coli MC1061 (Maniatis et al (1983), Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y.) a été utilisé comme hôte dans les expériences de clonage et E.coli HB101 (HsdR hsdM reA supE44 lacZ4 LeuB6 proA2 thi-1 Sm) (Boyer et al (1969) J. Mol. Biol. 41: 459-472) a été utilisé comme hôte pour l'analyse quantitative de l'expression de l'uréase. Les vecteurs et hybrides utilisés dans cette étude figurent dans le tableau 1. Les souches d'E.coli ont été cultivées dans du bouillon L sans glucose (10 g de tryptone, 5 g d'extrait de levure et 5 g de NaCl par litre, pH = 7,0) ou sur des boîtes de gélose L (contenant 1,5% de gélose) à 37°C. Les concentrations en antibiotiques pour la sélection des transformants ont été les suivantes (en milligrammes par litre) : kanamycine: 20, tétracycline: 8, ampicilline: 100, spectinomycine: 100, carbénicilline: 100. Pour l'expression de l'activité uréasique, les bactéries E.coli ont été cultivées sur un milieu limitant l'azote constitué de milieu gélosé minimum M9 sans ammonium (pH = 7,4) contenant 0,4% de D-glucose comme source de carbone et, sauf indication contraire, 0,2% (p/v) de L-glutamine stérilisée par filtration et fraîchement préparée (Pahel et al (1982) J. Bacteriol. 150: 202-213) comme source d'azote.

### Clonage moléculaire et analyses de l'ADN

Les digestions avec une endonucléase de restriction, le remplissage des extrémités et les autres manipulations courantes de l'ADN ont été effectués selon les techniques standard de Maniatis et coll. (Maniatis et al (1983), Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y.). Les digestions partielles avec Sau3A ont été faites à 20°C de façon à ralentir l'activité enzymatique. Les endonucléases de restriction, le grand fragment de l'ADN polymérase I, l'ADN polymérase de T4 (utilisée pour rendre franches les extrémités des fragments) et l'ADN ligase de T4 ont été fournis par Amersham Corp. La phosphatase alcaline d'intestin de veau a été fournie par Pharmacia. Les fragments d'ADN ont été séparés par électrophorèse sur des blocs horizontaux de gel contenant 1 ou 1,4% d'agarose et traités dans des tampons Tris-acétate ou Tris-phosphate (Maniatis et al (1983), Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y.). Une échelle de 1 kb (Bethesda Research Laboratories) a été utilisée comme standard de poids moléculaire. L'électroélution des fragments d'ADN à partir des gels d'agarose contenant du bromure d'éthidium (0,4 µg/ml) a été effectuée comme précédemment décrit (J. Bacteriol. 173: 1920-1931 (1991), Labigne et al).

### Activité uréasique

La détection de l'activité uréasique a été effectuée par remise en suspension de  $10^9$  bactéries dans 1 ml de milieu urée-indole (Diagnostic Pasteur) et incubation à 37°C pendant des périodes variables. La libération de

l'ammoniac due à l'activité uréasique a élevé le pH en provoquant un virage de l'orange au rouge.

L'activité uréasique a été mesurée selon la réaction de Berthelot, selon une modification du mode opératoire précédemment décrit (Ferrero et al (1991) Microb. Ecol. Hlth. Dis. 4: 121-134). Succinctement, les bactéries ont été recueillies à partir de boîtes de gélose dans 2,0 ml de NaCl à 0,85% stérile et centrifugées à 12 000 tr/min pendant 10 minutes à 4°C. Les culots ont été lavés deux fois dans du NaCl à 0,85% et remis en suspension dans du tampon phosphate de sodium à 100 mM (pH 7,4) contenant 10 mM d'EDTA (PEB). Pour préparer les extraits traités aux ultrasons, les cellules ont été lysées par quatre impulsions de 30 s avec un Branson Sonifier Model 450 réglé à 30 W, cycle 50%. Les débris cellulaires ont été éliminés avant les déterminations de l'uréase. Les échantillons fraîchement préparés (10-50 µl) ont été ajoutés à 200 µl de solution substrat d'urée (urée 50 mM préparée dans le PEB) et mis à réagir à la température ordinaire pendant 30 minutes. Les réactions ont été arrêtées par addition de 400 µl de réactif de phénol-nitroprussiate et 400 µl de réactif hypochlorite alcalin. Le mélange réactionnel a été incubé à 50°C. Des blancs, dans lesquels l'activité uréasique était inactivée par l'ébullition pendant 5 minutes avant l'addition du substrat, ont été traités de façon semblable. La quantité d'ammoniac libérée a été déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage établissant la relation entre  $A_{625}$  et la concentration en ammonium (à partir de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ). On a considéré que la libération de 2 µmol d'ammoniac équivalait à l'hydrolyse de 1 µmol d'urée. L'activité uréasique a été exprimée en µmol d'urée hydrolysée/min/mg de protéine bactérienne.

### Détermination des protéines

Les concentrations des protéines ont été déterminées selon l'essai de Bradford (Sigma Chemicals). Pour solubiliser les protéines dans les extraits de cellules entières, les suspensions cellulaires préparées dans du TPE ont été centrifugées et les culots ont été remis en suspension dans une solution d'octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside, afin d'établir une concentration finale en détergent (dans le réactif colorant) de 0,1-0,2% (p/v).

### Mutagenèse de transposon et construction de mutants

Le système d'apport MiniTn3-Km a été utilisé pour produire des mutations par insertion aléatoires dans le fragment d'ADN cloné dans pILL570.

Le système MiniTn3 décrit par Seifert et al (1986 PNAS USA 83: 735-739) faisant intervenir le plasmide pOX38 en tant que donneur de l'élément transposable et le plasmide pTCA agissant en trans et apportant l'enzyme transposase Tn3 (Seifert et al 1985 Genetic Engineering Principles and Methods Vol. 8: p.123-134 Setlow, J. and Hollaeinder, A. Editors, Plenum Press New-York), et la souche NS2114 hébergeant le gène cre codant pour la recombinaison P1 spécifique pour le site lox ont été utilisés pour la mutagenèse de fragments d'ADN avec les modifications suivantes :

- 1) le MiniTn3 a été modifié en enlevant le fragment BglI-EcoRI du gène codant pour la  $\beta$ -lactamase dans le plasmide pTn (Seifert et al 1986 précité), et en le remplaçant par la cassette kanamycine ClaI-C. jejuni (1,4 kb de longueur

décrit par Labigne-Roussel et al (1988 J. Bacteriol. 170: 1704-1708)). Ce nouvel agent d'insertion MiniTn3-Km a été transposé dans le plasmide transférable pOX38 tel que décrit par Seifert et al (1986 précité) conduisant à l'obtention du plasmide pILL553;

ii) on a utilisé le vecteur suicide pILL570 spectinomycine conjugatif préalablement décrit par Labigne et al (1991 J. Bacteriol. 173: 1920-1931) pour le clonage du fragment utilisé pour la mutagénèse. Ce vecteur suicide était dérivé de pILL560 (Labigne-Roussel et al 1988 J. Bacteriol. 170: 1704-1708) dont les séquences d'ADN responsables de l'immunité à Tn3 ont été délétées;

iii) le plasmide IncP, pRK212.1 du "complementing plasmid" (Figurski et al 1979 PNAS USA 76: 1648-1652) a été introduit par conjugaison dans E.coli souche NS2114 et un mutant rifampicine spontané de NS2214 hébergeant le gène cre a été obtenu et utilisé pour la sélection des transconjugants hébergeant le cointégrat;

iv) la résolution efficace des cointégrats (produits de co-intégration) a été sélectionnée de manière positive grâce au grand nombre de copies du plasmide dérivé de pILL570 en déposant sur des boîtes le troisième mélange obtenu sur un milieu contenant 500 µg de kanamycine et 300 µg de spectinomycine. Les expériences de conjugaison pour introduire le gène voulu interrompu par MiniTn3-Km dont le génome de la bactérie ont été réalisées par échange d'allèles selon la description de Labigne-Roussel 1988 précitée.



Séquençage de l'ADN

Les fragments appropriés d'ADN ont été clonés dans M13mp19 et M13mp18 (Meissing et al (1982) Gene 19: 269-276) pour lire indépendamment les deux brins complémentaires. Les clones contenant les fragments d'insertion ont été identifiés à l'aide de X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyrannoside) et d'isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyrannoside. Les brins simples des plasmides recombinés M13mp18 et M13mp19 ont été obtenus selon la méthode au polyéthylèneglycol (Sanger et al (1980) J. Mol. Biol. 143: 161-178). Le séquençage a été effectué selon la méthode d'arrêt de chaîne avec des didésoxynucléotides (Sanger et al (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467) à l'aide du nécessaire Sequenase (United States Biochemical corp.). Le séquençage de l'ADN bicaténaire a également été effectué par arrêt de chaîne avec des didésoxynucléotides avec le nécessaire Sequenase par emploi d'ADN plasmidique purifié sur un gradient de chlorure de césium (Zhang et al (1988) Nucleic Acids Research. 16: 1220). Des échantillons de 3  $\mu$ g d'ADN ont été d'abord dénaturés avec une solution de NaOH 1 M (volume total 20  $\mu$ l), puis neutralisés avec 2  $\mu$ l d'acétate d'ammonium 2 M (pH 4,6). L'ADN a été précipité après addition de 60  $\mu$ l d'éthanol à 100% glacé, incubation à -70°C pendant 10 Minutes et centrifugation à 4°C pendant 20 minutes. Après lavage avec 60  $\mu$ l d'éthanol à 80% glacé, le culot a été remis en suspension dans 10  $\mu$ l de tampon de séquençage contenant 0,5 pmol de l'amorce et incubé pendant 3 minutes à 65°C. Après une période d'incubation de 30 minutes à la température ordinaire, le séquençage a été effectué.

## RESULTATS

### Détection de l'activité uréasique dans une souche hôte d'E.coli hébergeant le cosmide recombinant pILL585

Des transformants d'E.coli hébergeant le cosmide pILL585 ont été étalés sur du milieu minimum M9 glucosé additionné de 0,2% de l-glutamine (comme seule source d'azote) ou du milieu L, et incubés à 37°C pendant 48 heures. Les transformants ont été ensuite criblés relativement à l'activité uréasique selon une essai colorimétrique qualitatif effectué dans du milieu urée-indole. L'activité n'a été observée que dans les transformants de E.coli HB101 ayant subi plusieurs passages (plus de 5 passages) sur le milieu minimum à 37°C en conditions d'aérobie. Ce sont donc les conditions qui ont été utilisées pour la détermination qualitative de l'expression de l'uréase dans les clones d'E.coli. Aucune activité uréasique n'a été détectée dans les transformants cultivés sur un milieu riche en azote.

La transformation de la souche E.coli HB101 avec le plasmide pILL590 contenant un fragment de 4,2 kb, identifié comme la région minimale nécessaire à l'expression de l'uréase dans C. jejuni (Labigne et al (1991) J. Bacteriol. 173: 1920-1931) dans les cellules d'E.coli, même après culture et passages dans un milieu limitant l'azote. Cela implique que les gènes présents sur le cosmide, mais absents du plasmide pILL590, sont nécessaires à l'expression de l'uréase chez E.coli.

Sous-clonage des gènes nécessaires à l'activité uréasique dans une souche d'E.coli

En l'absence d'activité uréasique détectable dans la souche d'E.coli hébergeant le plasmide recombinant pILL590, le fragment d'insertion de 34 kb du cosmide pILL585 a été soumis à une digestion partielle avec l'endonucléase Sau3A pour produire des fragments compris entre 7 et 12 kb. Ils ont été traités à la phosphatase alcaline, pour éviter tout réarrangement du génome initial, et ligaturés au plasmide pILL570 linéarisé avec BamHI. Après transformation dans E.coli HB101, chaque transformant résistant à la spectinomycine a été soumis à un essai ultérieur de sa capacité à hydrolyser l'uréase dans des conditions d'induction. Un clone présentait un phénotype uréase-positif. Il hébergeait un plasmide recombinant appelé pILL753. Ce plasmide contenait un fragment d'insertion de 11,2 kb. Les sites de reconnaissance BamHI et HindIII ont été cartographiés relativement aux sites de restriction uniques EcoRI et PstI du vecteur pILL570 (figure 1). La comparaison de la carte de restriction du plasmide pILL753 avec celle du plasmide recombinant précédemment décrit pILL590 a démontré que le fragment d'insertion de pILL753 avait un fragment d'ADN additionnel de 4,6 kb situé en aval des quatre gènes de l'uréase précédemment identifiés dans le plasmide pILL590 (c'est à dire ureA, ureB, ureC et ureD).

Optimisation de l'activité uréasique dans E.coli HB101

Pour définir les conditions de culture assurant l'expression optimale des gènes de l'uréase de H. pylori dans E.coli, l'activité de clones hébergeant

pILL753 a été évaluée quantitativement après culture sur un milieu limitant l'azote additionné de diverses sources d'azote. Dans tous les cas, un milieu de base minimum solide a été utilisé, car des études ont montré que l'activité uréasique était très faible, dans les cultures effectuées dans un milieu liquide.

Les activités relatives des cultures sur des milieux complétés par L-arginine, L-glutamine, L-glutamate,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  et l'urée (chacun à une concentration finale de 10 mM) étaient respectivement : 100%, 36%, 27%, 46% et 20%.

L'activité uréasique a été optimale dans les cultures effectuées sur un milieu additionné de L-arginine. L'activité uréasique n'a pas été détectée dans les cultures effectuées sur un milieu riche en azote.

Bien que la présence d'ions  $\text{Ni}^{2+}$  libres puisse avoir un effet de stimulation de l'activité uréasique (Mulrooney et al (1989) J. Gen. Microbiol. 135: 1769-1776 et Mobley et al (1989) Microbiol. Rev. 53: 85-108), ceci ne s'est pas manifesté sur l'activité uréasique des cellules hébergeant pILL753.

L'analyse au cours de l'expression de l'uréase dans le clone d'E.coli portant pILL753, cultivé dans diverses conditions, a indiqué que l'activité uréasique maximale était obtenue après 3 jours de culture aérobie à 37°C sur du milieu minimum additionné de L-arginine (figure 2). L'activité uréasique dans les cultures effectuées sur un milieu riche en azote était meilleure après culture en microaérobiose. En revanche, des conditions de microaérobiose ont eu un effet répressif sur les activités des cultures limitées en azote.

L'activité uréasique des cellules E.coli hébergeant pILL753 en culture en conditions d'aérobie pendant 3 jours à 37°C dans un milieu minimum additionné avec de l'arginine, était  $0,9 \pm 0,4$   $\mu\text{mol}$  d'urée hydrolysée par minute, par mg de protéine. Par comparaison l'isolat de H. pylori utilisé pour cloner les gènes de l'uréase hydrolysait l'urée à un taux de  $23,2 \pm 2,3$   $\mu\text{mol}/\text{mn}/\text{mg}$  protéine.

Identification et localisation des gènes nécessaires à l'activité uréasique dans une souche hôte d'E.coli

Pour déterminer la région d'ADN nécessaire au phénotype uréase-positif, des dérivés de pILL753 portant l'élément transposable MiniTn3-Km ont tout d'abord été isolés selon un mode opératoire précédemment décrit (voir Matériels et Méthodes). Des transformants d'E.coli HB101 portant les transposons ont tous été criblés relativement à l'activité uréasique. Ils ont été appelés pILL753::x où x désigne le site d'insertion de MiniTn3-Km tel qu'il apparaît sur la carte de la figure 1. Sur les 24 insertions choisies pour l'analyse, 10 dérivés avaient totalement perdu la capacité d'hydrolyser l'urée (2, 3, 4, 5, 6, 10, 11, 12, 13 et 14), tandis que 14 conservaient le phénotype uréase-positif. Ces résultats confirment que toute mutation d'insertion ayant une cartographie correspondant aux gènes ureA ou ureB (mutants 2, 3, 4, 5 et 6) abolit l'activité uréasique, mais démontrent également qu'un fragment d'ADN de 2,6 kb situé plus en aval du gène ureB est nécessaire à l'expression d'un phénotype uréase-positif dans E.coli cultivé dans des conditions limitant l'azote. En revanche, à partir des

résultats relatifs à la mutagenèse des transposons, un fragment d'ADN de 600 pb situé immédiatement en aval du gène ureB ne s'est pas révélé être essentiel à l'expression de l'activité uréasique dans E.coli.

Des analyses additionnelles comprenant l'établissement de délétions dans le fragment d'insertion pILL753 ont été effectuées pour mieux comprendre les conditions nécessaires à l'expression d'une uréase active dans les cellules d'E.coli. Des sous-clones d'E.coli portant les dérivés plasmidiques ont fait l'objet d'une détermination quantitative de l'activité uréasique dans les conditions de limitation de l'azote définies ci-dessus. Les résultats sont résumés au tableau 2. Tous les sous-clones étaient des dérivés du même vecteur pILL570, si bien que les résultats peuvent être comparés. L'un d'eux, le plasmide pILL768, a été obtenu par autoreligature du grand fragment EcoRI produit à partir du produit de digestion par une enzyme de restriction du plasmide pILL753::16 (figure 1). Cette construction a conduit à une délétion de 2,95 kb à l'extrémité 3' du segment d'insertion pILL753. Les cellules portant ce plasmide expriment une activité uréase comparativement faible (tableau 2). Le plasmide pILL763, a été obtenu par clonage du fragment de restriction ClaI-PstI du plasmide pILL753::1 dans le vecteur pILL570 linéarisé. Cette construction, dans laquelle un fragment d'ADN de 1,75 kb contenant les gènes ureC et ureD, précédemment décrits, était supprimé, exprimait une activité uréasique approximativement deux fois plus fortes que celles des cellules hébergeant pILL753. Dans aucun cas, des délétions ou des insertions n'ont conduit à une activité uréasique constitutive.

Analyse de la séquence de la région nécessaire à l'expression de l'uréase dans E.coli

Dans le fragment de 11,2 kb nécessaire à l'expression de l'uréase dans E.coli, un fragment d'ADN de 3,2 kb localisé immédiatement en aval du gène ureB, a été identifié suivant la stratégie de la figure 3.

i) les fragments HindIII de 1,2 kb et BamHI-HindIII de 1,3 kb, ainsi que l'extrémité des gros fragments de 1,3 kb de BamHI, ont été séquencés indépendamment par clonage des fragments de restriction BamHI-HindIII et BamHI-SphI dans les plasmides mutants respectifs pILL753::12, pILL753::11; pILL753::10 dans l'ADN des phages M13mp18 et M13mp19;

ii) les fragments de restriction HindIII de 1,2 kb, BamHI-PstI de 3,8 kb et BamHI-PvuII de 1,3 kb provenant des plasmides pILL753 et pILL589 (précédemment décrits) ont été clonés dans l'ADN des phages M13mp18 et M13mp19;

iii) douze amorces oligonucléotidiques ont été synthétisées pour confirmer la lecture et produire des séquences chevauchant les trois fragments séquencés indépendamment. Ces amorces ont été utilisées pour des analyses de séquençage d'ADN double brin.

L'analyse de la séquence a révélé cinq cadres de lecture ouverts (ORFs) appelés ureI, ureE, ureF, ureG et ureH. Ces gènes sont tous transcrits dans la même direction et il est prévu qu'ils codent pour des peptides de 195, 170, 256, 199 et 265 acides aminés. Aucun ORF de longueur notable n'a été observé sur le

complément inverse de la séquence illustrée par la figure 4. Les cinq ORF débutent par le codon de départ caractéristique ATG. Quatre des cinq ORF étaient précédés de sites semblables à la séquence consensus de liaison au ribosome (Shine-Dalgarno) d'E.coli (Shine et al (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 1342-1346).

Les régions d'amont de chaque ORF ont fait l'objet d'une recherche de la présence des sites de régulation azotée avec la séquence TGGYAYRN<sub>1</sub>YGCZ dans laquelle Y = T ou C, R = G ou A et Z = A ou T (Morett et al (1989) J. Mol. Biol. 210: 65-77). Un seul site a été trouvé à 210 pb en amont du locus ureG. Sa position précise est représentée sur la figure 4. Des séquences consensus de type promoteur d'E.coli( $\sigma$ 70) ont été observées en amont des gènes ureI, ureF et ureH (TTGACA, -35 et TATAAT, -10).



**TABIEAU 1 :**

**Vecteurs et plasmides hybrides utilisés dans le cadre de cette étude**

Plasmide	Vecteur	Caractéristiques * phénotypiques	Taille (Kb)	Origine de l'insertion	Références
	pILL550	RepEcRepCj mob Km	8,3		Labigne-Roussel et al
	pILL570	RepEcmob Sp	5,3		Labigne A. et al
	pILL575	RepEcRepCj mob Km Cos	10		Labigne A. et al
pILL585	pILL575	RepEcRepCj mob Km Cos	44	<u>Sau3A</u> digestion partielle de 85P	Labigne A. et al
pILL590	pILL550	RepEcRepCj mob Km	16,4	<u>Sau3A</u> digestion partielle de pILL585	Labigne A. et al
pILL753	pILL570	RepEcmob Sp	16,5	<u>Sau3A</u> digestion partielle de pILL585	décrit ici
pILL763	pILL570	RepEcmob Sp	14,75	Fragment <u>Clal-Pst1</u> de pILL753::1	décrit ici
pILL768	pILL570	RepEcmob Sp	15,35	Fragment <u>EcoR1</u> de pILL753::16	décrit ici

\* RepEc et RepCj : plasmides capables de se répliquer dans E.coli et C. jejuni respectivement -  
mob : plasmide de conjugaison due à la présence de Ori-T  
Km et Sp : résistance à la kanamycine et à la spectinomycine  
Cos : présence d'un site / cos

TABLEAU 2 :

Mutagenèse de l'ADN cloné de *H. pylori* et effet de l'activité uréase dans les clones de *E.coli* HB101 mis en culture dans des conditions limitantes en azote(3)

Plasmide	Génotype différent de <i>E.coli</i> HB101 pILL753	Activité uréase ( $\mu\text{mol urea/min/mg}$ )
pILL753 (2)	-	0,86
pILL753::3	<u>ureA</u> dégradée	neg (3)
pILL753::6	<u>ureB</u> dégradée	neg
pILL753::8	<u>ureI</u> dégradée	0,86
pILL753::10	<u>ureF</u> dégradée	neg
pILL753::11	<u>ureG</u> dégradée	neg
pILL753::13	<u>ureH</u> dégradée	neg
pILL753::16	dégradation en aval <u>ureH</u>	0,73
pILL763	<u>ureC</u> et <u>ureD</u> délétées	2,0
pILL768	délétion 5' en aval de <u>ureH</u>	0,10

- (1) Bactéries mises en culture dans un milieu aérobie pendant 3 jours dans un milieu minimum M9 complétée avec 0.01 M L-arginine à 37°C.
- (2) Pour des raisons de comparaison l'activité uréase de *H.pylori* 85P, isolat à partir duquel l'ADN a été cloné, était de  $23 \pm 2.3 \mu\text{mol urea/min/mg}$  protéine.
- (3) Aucune activité uréase n'a été détectée.

### DISCUSSION

Le premier cas d'expression fonctionnelle de gènes provenant de H. pylori dans des souches d'E.coli est présenté ici.

Ceci a été possible en cultivant des cellules de E.coli hébergeant le cosmide recombinant de l'uréase pILL585 (Labigne et al précité - 1991) sur un milieu minimum contenant une source limitant l'azote. Les résultats obtenus ont permis de montrer que les gènes de l'uréase de H. pylori pouvaient être sous le contrôle du système de régulation de l'azote (NTR); et que l'activité uréase dans les cellules de E.coli était dépendante de la présence d'un ensemble de gènes qui ont été décrits dans les pages précédentes. Cet ensemble de gènes a été localisé immédiatement en aval des quatre gènes ureA, ureB, ureC et ureD décrits dans la publication de Labigne et al, 1991 précitée. Ces nouveaux gènes sont situés sur un fragment de 3,2 kb comportant cinq cadres ouverts de lecture qui sont désignés par ureI, ureE, ureF, ureG et ureH.

La mise en oeuvre de mutations insertionnelles, et de délétions, au niveau du fragment d'ADN de 11,2 kb (pILL753) sous-cloné à partir du cosmide d'origine, a permis de montrer que les gènes ureA, ureB, ureF, ureG et ureH étaient nécessaires à l'expression de l'activité uréasique dans E.coli. Au contraire des mutations insertionnelles à l'intérieur du gène ureI n'ont pas affecté sensiblement l'activité uréasique dans les cellules de E.coli. La délétion du gène ureC et du gène ureD (comme dans le plasmide pILL763) a résulté dans des activités qui étaient significativement plus fortes que celles obtenues dans

les cellules portant les plasmides avec les loci intacts, suggérant un rôle régulateur de cette région du cluster du gène de l'uréase de H. pylori.

Il apparaît clair que pILL753 ne porte probablement pas l'ensemble des éléments nécessaires à l'expression complète de l'uréase. La principale preuve pour cela est que : d'une part les cellules de E.coli hébergeant pILL753 avaient une activité uréasique approximativement 25 fois plus faible que celle de l'isolat H. pylori utilisé à l'origine pour le clonage; d'autre part la délétion de la région en aval de ureH (pILL768) a conduit à une diminution considérable de l'activité uréasique. Il est intéressant de remarquer que C. jejuni nécessite la présence d'un nombre de gènes plus faible pour l'expression enzymatique en comparaison avec les résultats obtenus chez E.coli. En conséquence C. jejuni doit être capable de compléter les fonctions des gènes clonés de H. pylori.

La nécessité de gènes accessoires a également été démontrée pour les Providencia stuartii (Mulrooney et al (1988) J. Bacteriol. 170: 2202-2207), un E.coli uréase positif (Collins et al - 1988), Klesiella pneumonia (Gerlach et al (1988) FEMS Microbiol. Lett. 50: 131-135), Proteus vulgaris (Mörsdorf et al (1990) FEMS Microbiol. Lett. 66: 67-74), Staphylococcus saprophyticus (Gatermann et al (1989) Infect. Immun. 57: 2998-3002), Klebsiella aerogenes (Mulrooney et al - 1990) et Proteus mirabilis (Ferrero et al - 1991 et Walz et al (1988) J. Bacteriol. 170: 1027-1033).

La figure 5 présente une comparaison de trois régions codant pour l'uréase, pour plusieurs espèces de bactéries et montre les similitudes ainsi que les

particularités de chacune. Le degré de parenté, en terme d'organisation génétique et de polypeptides codés, est plus fort entre P. mirabilis et K. aerogenes que pour chacun d'entre eux vis à vis de H. pylori. Alors que le polypeptide UreG de H. pylori présentait une homologie forte avec celui de K. aerogenes (92% de conservation et 59% d'identité), les degrés de (conservation et identité) entre les polypeptides UreE et UreF de H. pylori et K. aerogenes étaient : (33% et 14%), (44% et 11,6%), respectivement. -Mulrooney et al ont constaté que les gènes de K. aerogenes codant pour les protéines accessoires UreE, UreI et UreG sont impliquées dans l'activation de l'apoenzyme par incorporation de nickel dans des sous-unités de l'uréase. Du fait de la présence de séries de résidus histidine à l'extrémité carboxy-terminale du polypeptide UreE de Klebsiella et de Proteus, Mulrooney et al ont proposé que UreE pourrait interagir avec le nickel pour le transférer ensuite à l'apoenzyme. Une telle série de résidus n'a pas été trouvée sur le polypeptide UreE de H. pylori ni sur aucun autre des produits des gènes uréases.

La recherche de similitudes entre la séquence d'acides aminés déduite des gènes de l'uréase de H. pylori et les séquences consensus impliquées dans un site de liaison de l'ADN (Pabo et al - 1981) ou dans des sites de liaison de l'ATP (Higgins et al - 1985) a permis l'identification d'un site de liaison de l'ADN à l'intérieur du produit du gène ureI (figure 4). De plus un site de liaison de l'ATP bien conservé (-GVCGSGKT-) existe à l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale du produit du gène ureG.

La région de l'uréase de H. pylori présente certains éléments uniques qui sont les suivants : tout d'abord les gènes ureC, ureD, ureI et ureH sont uniques pour H. pylori. Ensuite la région de l'uréase consiste en trois blocs de gènes qui sont transcrits dans la même direction et présentent une région intergénique de 420 bp entre ureD et ureA et 200 bp entre ureB et ureI. Ceci suggère une organisation génétique particulière à H. pylori, dans laquelle les trois blocs de gènes peuvent être régulés indépendamment.

Il est généralement admis que la synthèse d'uréase par H. pylori se fait de façon constitutive. Les résultats présentés ici tendent à montrer que l'expression des gènes de l'uréase de H. pylori pourrait en fait être sous le contrôle d'un système de régulation. En effet l'expression des gènes uréases de H. pylori une fois transférés chez E.coli, est totalement sous le contrôle du système de régulation de l'azote (NTR). Il est possible que les gènes de l'uréase de H. pylori, soient directement dépendants de la synthèse des produits des gènes ntrA, ntrB, ntrC de E.coli mais on ne peut exclure qu'ils soient dépendants de l'expression d'un ou de plusieurs autres gènes codant pour une (des) protéine (s) régulatrice (s) analogue (s) aux produits ntr de E.coli. Sur la base de ces données on peut penser que des paramètres physiologiques, tels que la présence d'un milieu solide ou d'une atmosphère microaérophile puisse jouer un rôle dans l'expression de l'uréase chez H. pylori in vitro ou in vivo.

## II - PREPARATION DE SOUCHES MUTANTES

- Souches utilisées pour les expériences d'électroporation : plusieurs souches isolées de biopsies ont été testées pour leur aptitude à être électroporées incluant la souche 85P décrite dans la publication de Labigne et al - 1991 précitée, à partir de laquelle le clonage initial des gènes de l'uréase a été réalisé. Une seule souche désignée N6 déposée à la CNCM sous le numéro I-1150 le 3 Octobre 1991, a donné des résultats positifs.
- Création des mutants dans le fragment cloné du chromosome de H. pylori, souche 85P : les mutants sont préparés par mutagenèse à l'aide d'un transposon (MiniTn3-Km) qui permet l'insertion au hasard de l'élément pour la recombinaison de la souche (élément de transposition). Le site d'insertion de chacun des éléments de transposition a été défini par analyses de restriction des plasmides dérivés (cf figure 1).
- Electroporation :  $10^{10}$  cellules de H. pylori ont été récoltées sur gélose au sang (10% de sang de cheval) lavées dans une solution de glycérol/sucrose (15% v/v et 9% w/v) et resuspendues sous un volume de 50  $\mu$ l à 4°C. 500 ng d'ADN plasmidique purifié sur CsCl et dialysé extemporanément contre de l'eau distillée ont été ajoutés sous un volume de 1  $\mu$ l aux cellules à 4°C. Après 1 minute sur la glace les cellules d'ADN ont été transférées dans une cuvette d'électroporation prérefroidie à -20°C (BioRad

réf : 165-2086, de 0,2 cm de largeur), puis placée dans l'appareil "Gene pulser Apparatus - BioRad) pour lequel il a été fixé les paramètres suivants : 25F, 2.5kV et 200 ohms. Après avoir délivré l'impulsion électrique avec des constantes de temps 4,5 à 5 msec, les bactéries ont été resuspendues dans 100  $\mu$ l de tampon SOC (2% Bacto tryptone, 0,5% Bacto yeast extract, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM glucose), et inoculées sur gélose au sang non sélective (sans kanamycine, mais incluant vancomycine, trimethoprime, polymixine, acide nalidixique, amphotéricine B) pendant 48 heures à 37°C sous atmosphère microaérophile. Les bactéries sont ensuite récoltées, resuspendues dans un volume minimum (0,5 ml) et étalées sur boîtes de gélose au sang sélective (incluant 20  $\mu$ g/ml de kanamycine et le cocktail antibiotique décrit ci-dessus). La croissance de bactéries transformées et résistantes à la kanamycine apparaît après 4 jours d'incubation à 37°C en atmosphère microaérophile.

Les autres techniques incluant PCR, Southern, et Western sont des techniques classiques.

### RESULTATS

Deux mutations générées par insertion de MiniTn3-Km dans le gène ureB présent sur le plasmide pILL753 ont été étudiées en détail. Il s'agit des mutations numérotées 3 et 4. La position précise de chacune des insertions est donnée à la figure 6. Les plasmides correspondant à ces insertions ont été préparés, purifiés et concentrés. Des bactéries résistantes à la



kanamycine présentant toutes les caractéristiques de la souche utilisée pour l'électroporation ont été obtenues; elles sont totalement incapables d'hydrolyser l'urée.

Des contrôles ont permis de vérifier que la souche mutante est une souche isogénique :

- \* bien que "uréase négative" les souches ont les propriétés biochimiques caractéristiques des bactéries appartenant à l'espèce H. pylori (oxydase, catalase, sensibilité à l'oxygène);
- \* les bactéries mères (N6) (CNCM n°I-1150) et les bactéries isogéniques N6::TnKm-3 et N6::TnKm-4 ont les mêmes profils de restriction après digestion enzymatique des ADN totaux (cf figure 8);
- \* après amplification enzymatique à l'aide des primers spécifiques de H. pylori et séquençage du produit amplifié, les mêmes séquences nucléotidiques ont été trouvées alors que des souches indépendantes de H. pylori ne présentent jamais la même séquence, mais au contraire un polymorphisme génique important;
- \* l'analyse par hybridation type Southern des profils de restriction par BamHI et HindIII des ADN des souches parentales et mutées témoigne du remplacement des gènes (figure 7 et son interprétation figure 6).

Une des difficultés rencontrées provient du fait que la souche transformée (N6) n'est pas celle à partir de laquelle le clonage des gènes de l'uréase a été réalisé, cette dernière souche

étant la souche 85P et que les sites de restriction HindIII et BamHI ne sont pas conservés d'une souche à l'autre : une sonde correspondant au fragment de 8,1 kb provenant de pILL590 (figure 1) montre clairement des profils de restrictions HindIII qui diffèrent entre N6 et 85P (figure 9), en particulier absence des fragments de 1,25 kb et 1,15 kb. Par contre les fragments HindIII de 4,1 kb et BamHI de 5,1 et de 1,3 kb sont conservés. Il a donc été vérifié par amplification enzymatique (PCR) à l'aide d'oligonucléotides répartis sur l'ensemble de la région correspondant aux gènes ureA, ureB, ureC et ureD) que les produits d'amplification 1 à 6 montrés figure 10 étaient les mêmes dans les deux souches, et que l'absence des sites de restrictions HindIII reflétait le polymorphisme génique et non un réarrangement majeur de la région uréase. Une telle vérification faite, il est possible de confirmer sans ambiguïté le remplacement génique de l'allèle sauvage par l'allèle muté dans les deux mutants créés.

- \* enfin il a été vérifié par immunobuvardage à l'aide d'anticorps anti-uréase, ou anti H. pylori préparés chez le lapin, ou anti-H. pylori présents dans le sérum de patients infectés par H. pylori, que les souches mutées N6::TnKm-3 et N6::TnKm-4 n'exprimaient plus le polypeptide de 61 kDaltons codé par le gène ureB et donc que le gène ureB de ces souches avait bien été interrompu (figure 11).

REVENDICATIONS

1/ Séquence nucléotidique, caractérisée en ce qu'elle est constituée par, ou en ce qu'elle comprend au moins une des séquences nucléiques correspondant aux gènes appelés ureE, ureF, ureG, ureH, ureI et répondant aux enchainements nucléotidiques présentés à la figure 4 ou, toute partie d'au moins une de ces séquences nucléiques.

2/ Séquence nucléotidique selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est modifiée par délétion, addition, substitution ou inversion d'un ou plusieurs nucléotides de telle façon que les propriétés fonctionnelles des polypeptides codés par ces séquences modifiées sont soit conservées soit atténuées, voire supprimées, par rapport aux propriétés des polypeptides UreE, UreF, UreG, UreH ou UreI, tels qu'exprimés par H.pylori, ou de telle façon que cette séquence modifiée n'exprime pas de polypeptide chez H. pylori.

3/ Séquence nucléotidique selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle est constituée par ou en ce qu'elle comprend :

- a) l'ensemble des séquences nucléiques correspondant aux gènes appelés ureE, ureF, ureG, ureH, ureI et répondant aux enchainements nucléotidiques présentés à la figure 4 ou,
- b) l'ensemble formé par les séquences nucléiques (variantes) correspondant à ces gènes modifiés indépendamment les uns des autres, de telle façon que l'ensemble de ces variantes code pour des polypeptides ayant une homologie fonctionnelle avec les polypeptides UreE, UreF, UreG, UreH ou UreI tels qu'exprimés par H.pylori, ou au contraire code pour des polypeptides modifiés, pour atténuer voire supprimer les propriétés

fonctionnelles des polypeptides UreE, UreF, UreG, UreH ou UreI tels qu'exprimés par H. pylori ou, n'est plus exprimé en tant que polypeptides.

4/ Séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle est associée aux séquences nucléiques correspondant aux gènes de structure ureA et ureB codant pour les sous-unités uréasiques chez H. pylori.

5/ Séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'elle est associée aux gènes ureA, ureB, ureC et/ou ureD codant pour l'uréase chez H. pylori.

6/ Séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'elle répond à l'enchaînement ureE correspondant aux nucléotides 800 à 1309 de la séquence de la figure 4, ou à tout fragment de cet enchaînement dès lors qu'il hybride dans des conditions stringentes avec l'enchaînement ureE ou avec la séquence complémentaire à cet enchaînement.

7/ Séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'elle répond à l'enchaînement ureF correspondant aux nucléotides 1324 à 2091 de la séquence de la figure 4, ou à tout fragment de cet enchaînement dès lors qu'il hybride dans des conditions stringentes avec l'enchaînement ureF ou avec la séquence complémentaire à cet enchaînement.

8/ Séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'elle répond à l'enchaînement ureG correspondant aux nucléotides 2123 à 2719 de la séquence de la figure 4, ou à tout fragment de cet enchaînement dès lors qu'il hybride dans des conditions stringentes avec l'enchaînement

ureG ou avec la séquence complémentaire à cet enchaînement.

9/ Séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'elle répond à l'enchaînement ureH correspondant aux nucléotides 2722 à 3516 de la séquence de la figure 4, ou à tout fragment de cet enchaînement dès lors qu'il hybride dans des conditions stringentes avec l'enchaînement ureH ou avec la séquence complémentaire à cet enchaînement.

10/ Séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'elle répond à l'enchaînement ureI correspondant aux nucléotides 211 à 795 de la séquence de la figure 4, ou à tout fragment de cet enchaînement dès lors qu'il hybride dans des conditions stringentes avec l'enchaînement ureI ou avec la séquence complémentaire à cet enchaînement.

11/ Séquence nucléotidique selon la revendication 6, caractérisée en ce qu'elle répond à l'enchaînement nucléotidique suivant ou en ce qu'elle comprend cet enchaînement :

GCG AAA ATA TGC TAT GAA ATA GGA AAC CGC CAT

12/ Sonde nucléotidique, caractérisée en ce qu'elle est constituée par une séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, ladite séquence étant marquée.

13/ Amorce nucléotidique, caractérisée en ce qu'elle comprend un fragment nucléotidique tel qu'issu d'une séquence selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, comprenant environ 18 à environ 30, de préférence environ 25 à environ 30 nucléotides, pour l'utilisation dans une réaction d'amplification génique.

14/ Séquence nucléotidique, caractérisée en ce qu'elle hybride dans des conditions stringentes avec une séquence selon l'une quelconque des revendications 1 à 13.

15/ Utilisation d'une amorce selon la revendication 13, pour la détection in vitro d'une infection par H. pylori, à partir d'un échantillon biologique et à l'issue de réactions d'amplification génique.

16/ Utilisation d'une sonde selon la revendication 12, pour la détection in vitro dans un échantillon biologique, d'une infection par H. pylori, le cas échéant à l'issue de réactions d'amplification génique.

17/ Polypeptide, caractérisé en ce qu'il correspond à l'un des polypeptides UreE, UreF, UreG, UreH ou UreI présentés à la figure 4, ou, à toute partie d'au moins un de ces polypeptides.

18/ Polypeptide selon la revendication 17, sous forme modifiée par addition, substitution, délétion ou inversion d'un ou plusieurs acides aminés, pour atténuer, voire supprimer ses propriétés dans la régulation et/ou la maturation de l'uréase telle qu'exprimée par les polypeptides UreE, UreF, UreG, UreH, UreI dans H. pylori.

19/ Vecteur recombinant, caractérisé en ce qu'il contient une séquence selon l'une quelconque des revendications 1 à 11.

20/ Vecteur recombinant selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un cosmide ou d'un plasmide.

21/ Vecteur recombinant selon l'une quelconque des revendications 19 ou 20, caractérisé en ce qu'il s'agit du plasmide pILL753 contenu dans E.coli HB101, déposé à la CNCM le 3 Octobre 1991 sous le numéro I-1148.

22/ Vecteur recombinant selon l'une quelconque des revendications 19 ou 20, caractérisé en ce qu'il s'agit du plasmide pILL763 contenu dans E.coli HB101 déposé à la CNCM le 3 Octobre 1991 sous le numéro I-1149.

23/ Hôte cellulaire recombinant différent de H. pylori, caractérisé en ce qu'il est transformé par une séquence selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 ou 14, dans des conditions permettant son expression dans l'hôte.

24/ Hôte cellulaire recombinant selon la revendication 23, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une souche de H. pylori comprenant une séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 2 à 11 ou 14.

25/ Hôte cellulaire recombinant selon la revendication 24, tel qu'obtenu par mutation de la souche N6 de H. pylori, déposée à la CNCM le 3 Octobre 1991 sous le numéro I-1150, au niveau de l'un au moins des gènes ureE, ureF, ureG, ureH ou ureI.

26/ Hôte cellulaire recombinant selon la revendication 21, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une souche E.coli modifiée par une séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 11.

27/ Hôte cellulaire recombinant selon l'une quelconque des revendications 22 à 26, caractérisé en ce que son activité uréasique est atténuée.

28/ Composition immunogène, caractérisée en ce qu'elle contient un hôte cellulaire recombinant selon l'une quelconque des revendications 23 à 27.

29/ Kit pour le diagnostic in vitro d'une infection par H. pylori sur un échantillon biologique déterminé, caractérisé en ce qu'il comprend :

- au moins un couple d'amorces nucléotidiques selon la revendication 13, capables d'hybrider aux extrémités 5' et en 3' d'un fragment nucléotidique

spécifique d'au moins un gène choisi parmi ureE, ureF, ureG, ureH ou ureI,

- des réactifs nécessaires à l'extraction des acides nucléiques à partir de l'échantillon traité,

- des réactifs pour effectuer la polymérisation dudit fragment nucléotidique, à partir des amorces nucléotidiques, notamment des enzymes de polymérisation, en quantité suffisante pour réaliser l'amplification du fragment que l'on souhaite amplifier,

- au moins un enchaînement de nucléotides pouvant être utilisé comme sonde et capable d'hybrider dans des conditions déterminées avec le fragment nucléotidique amplifié,

- le cas échéant des moyens pour révéler l'hybridation.

30/ Kit pour le diagnostic in vitro d'une infection par H. pylori, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une quantité déterminée de sonde selon la revendication 12,

- un milieu approprié pour la réalisation d'une réaction d'hybridation entre l'acide nucléique de H. pylori à détecter et la sonde,

- des réactifs pour la détection des hybrides éventuellement formés.

31/ Anticorps polyclonal ou monoclonal, caractérisé en ce qu'il reconnaît un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 ou 18 ou un fragment de ce polypeptide.



22/ Vecteur recombinant selon l'une quelconque des revendications 19 ou 20, caractérisé en ce qu'il s'agit du plasmide pILL763 contenu dans E.coli HB101 déposé à la CNCM le 3 Octobre 1991 sous le numéro I-1149.

23/ Hôte cellulaire recombinant différent de H. pylori, caractérisé en ce qu'il est transformé par une séquence selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 ou 14, dans des conditions permettant son expression dans l'hôte.

24/ Hôte cellulaire recombinant selon la revendication 23, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une souche de H. pylori comprenant une séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 2 à 11 ou 14.

25/ Hôte cellulaire recombinant selon la revendication 24, tel qu'obtenu par mutation de la souche N6 de H. pylori, déposée à la CNCM le 3 Octobre 1991 sous le numéro I-1150, au niveau de l'un au moins des gènes ureE, ureF, ureG, ureH ou ureI.

26/ Hôte cellulaire recombinant selon l'une quelconque des revendications 23 à 25, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une souche E.coli modifiée par une séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 11.

27/ Hôte cellulaire recombinant selon l'une quelconque des revendications 23 à 26, caractérisé en ce que son activité uréasique est atténuée.

28/ Composition immunogène, caractérisée en ce qu'elle contient un hôte cellulaire recombinant selon l'une quelconque des revendications 23 à 27.

29/ Kit pour le diagnostic in vitro d'une infection par H. pylori sur un échantillon biologique déterminé, caractérisé en ce qu'il comprend :

- au moins un couple d'amorces nucléotidiques selon la revendication 13, capables d'hybrider aux

extrémités 5' et en 3' d'un fragment nucléotidique spécifique d'au moins un gène choisi parmi ureE, ureF, ureG, ureH ou ureI,

- des réactifs nécessaires à l'extraction des acides nucléiques à partir de l'échantillon traité,

- des réactifs pour effectuer la polymérisation dudit fragment nucléotidique, à partir des amorces nucléotidiques, notamment des enzymes de polymérisation, en quantité suffisante pour réaliser l'amplification du fragment que l'on souhaite amplifier,

- au moins un enchaînement de nucléotides pouvant être utilisé comme sonde et capable d'hybrider dans des conditions déterminées avec le fragment nucléotidique amplifié,

- le cas échéant des moyens pour révéler l'hybridation.

30/ Kit pour le diagnostic in vitro d'une infection par H. pylori, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une quantité déterminée de sonde selon la revendication 12,

- un milieu approprié pour la réalisation d'une réaction d'hybridation entre l'acide nucléique de H. pylori à détecter et la sonde,

- des réactifs pour la détection des hybrides éventuellement formés.

31/ Anticorps polyclonal ou monoclonal, caractérisé en ce qu'il reconnaît un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 ou 18 ou un fragment de ce polypeptide.

FIGURE 1

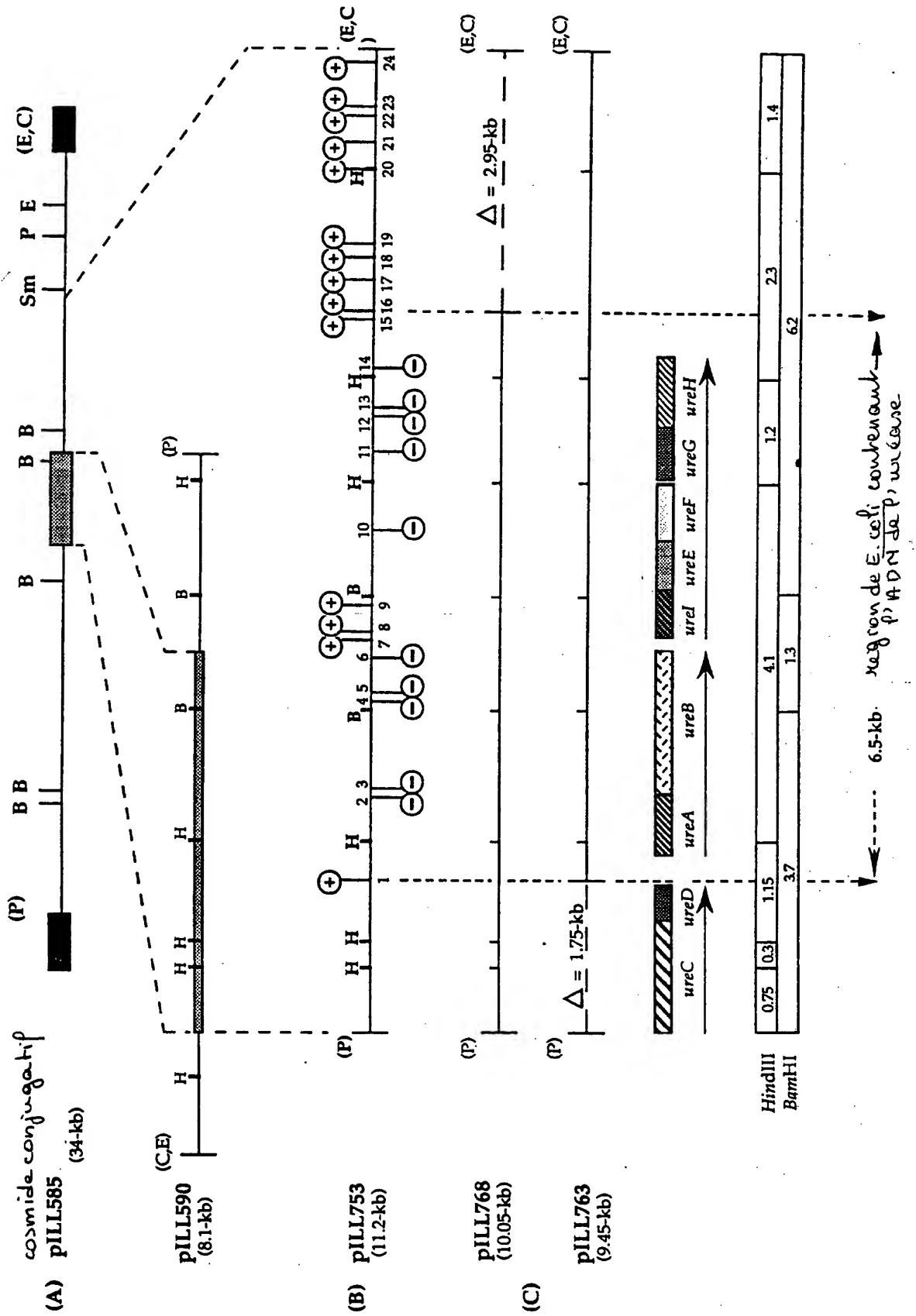
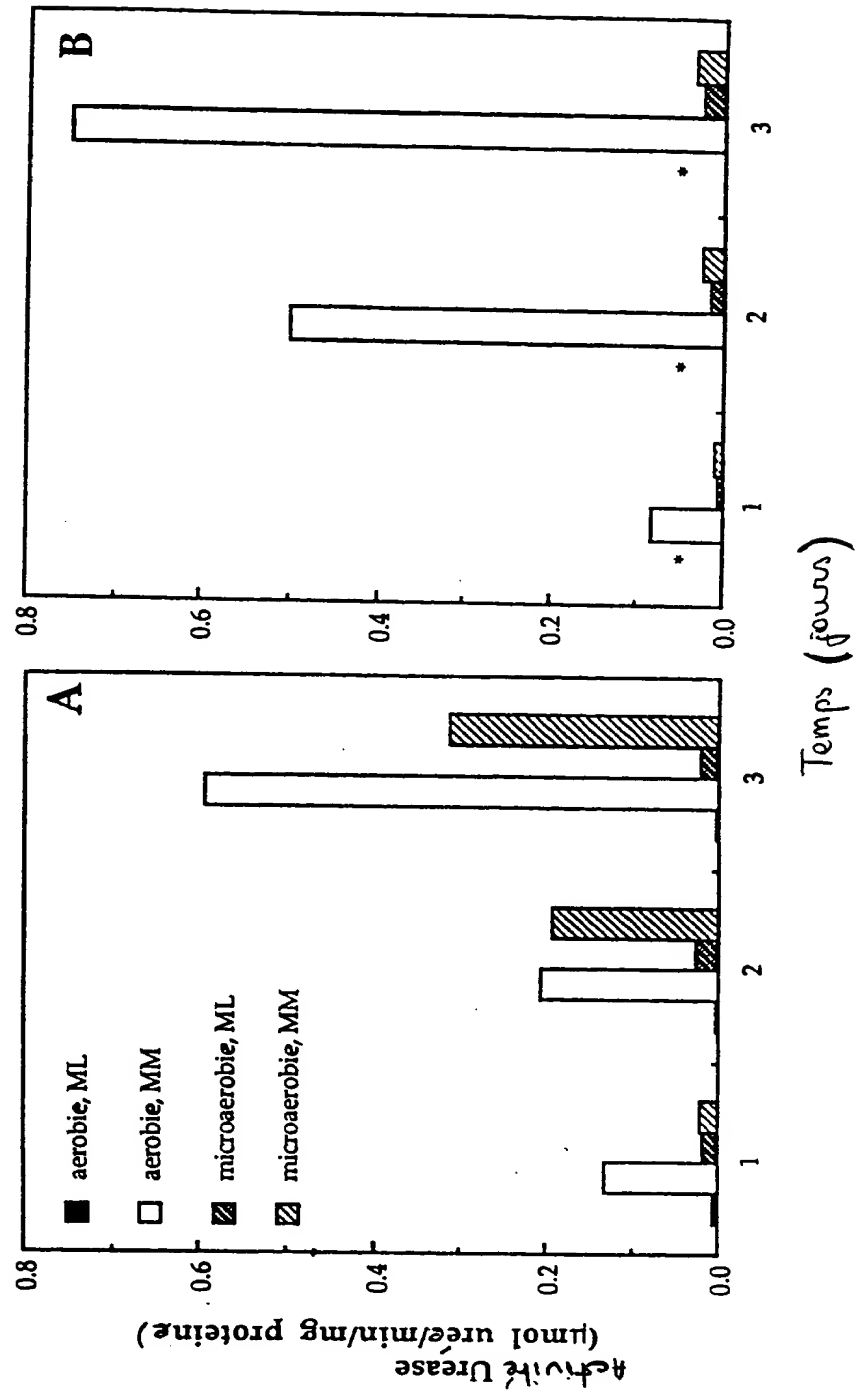
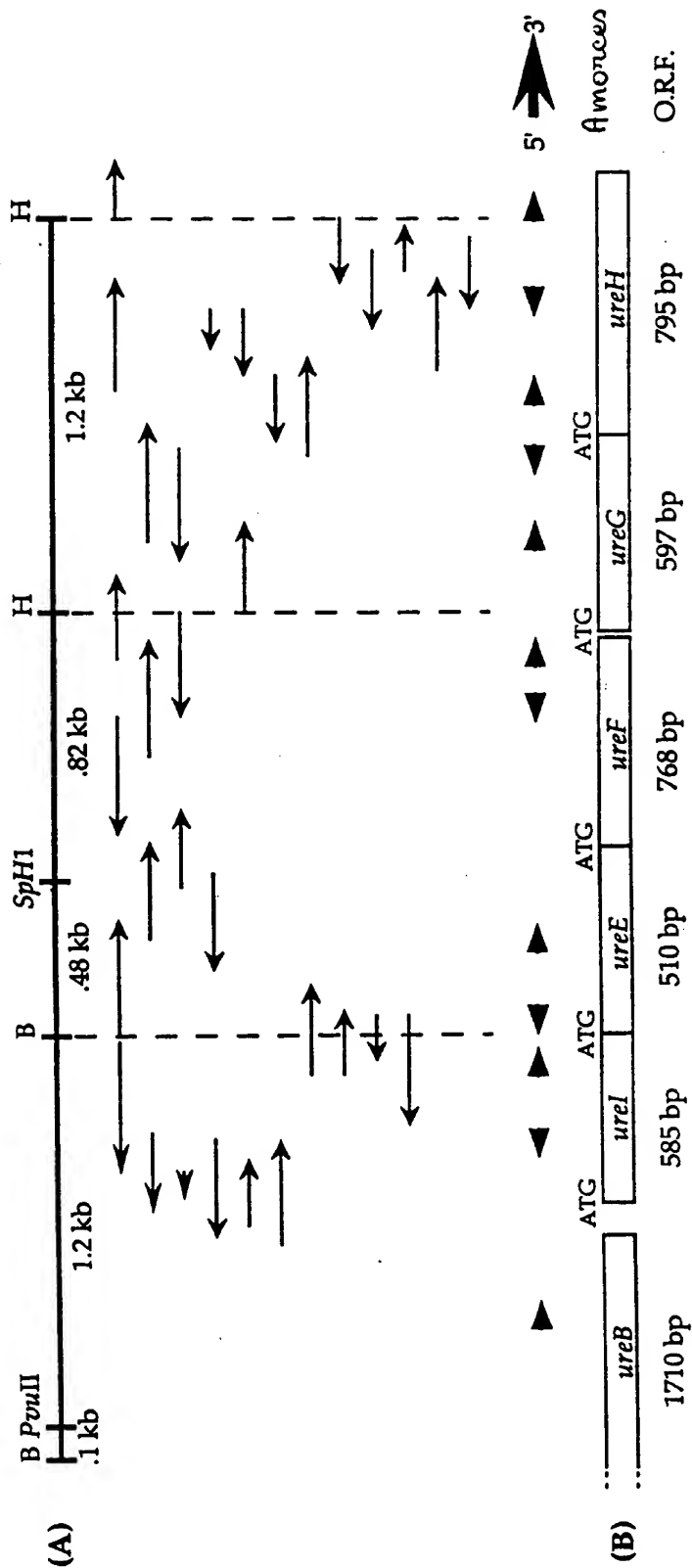


FIGURE 2



3/20



(C)

UreI: - 195 a.a.	UreE: - 170 a.a.	UreF: - 256 a.a.	UreG: - 199 a.a.	UreH: - 265 a.a.
- 21 681 D	- 19 461 D	- 28 617 D	- 21 744 D	- 29 650 D

FIGURE 3

# FIGURE 4

1 A CTC TTT AGC ATT TTC TAG GA TTT TTT AGG AGC AAC GCT CTT AGA TCC TTA GTT TTT AGC  
 --leu phe ser ile phe AMB  
 61 TCT CTG ATT TTT TGT TTA TCA AAA AAT TGG GGG CTT TTT TTG TTT TTA TTT TTT GTC AAT  
 91  
 121 TTA CTA TTT TTC TTT ATG ATT AGC TCA AGC AAC AAA AGT TAT TCG TAA GGT GCG TTT GTT  
 151  
 181 GTA AAA ATT TTT GTT TGG AAG GAA AAG GCA ATG CTA GGA CTT GTA TTG TTA TAT GTT GGG  
 211  
 Met leu gly leu val leu leu tyr val gly  
 ureI  
 241 ATT GTT TTA ATC AGC AAT GGG ATT TGC GGG TTA ACC AAA GTC GAT CCT AAA AGC ACT GCG  
 ile val leu ile ser asn gly ile cys gly leu thr lys val asp pro lys ser thr ala  
 301 GTG ATG AAC TTT TTT GTG GGT GGG CTC TCC ATT ATT TGT AAT GTG GTT GTC ATC ACT TAT  
 val met asn phe phe val gly gly leu ser ile ile cys asn val val val ile thr tyr  
 361 TCC GCT CTC AAC CCT ACA GCC CCT GTA GAA GGT GCT GAA GAT AAT GCT CAA GTA TCA CAC  
 ser ala leu asn pro thr ala pro val glu gly ala glu asp ile ala gln val ser his  
 421 CAT TTG ACT AAT TTC TAT GGG CCA GCG ACT GGG TTA TTG TTT GGT TTC ACC TAC TTG TAT  
 his leu thr asn phe tyr gly pro ala thr gly leu leu phe gly phe thr tyr leu tyr  
 451

5/20

FIGURE 4 (suite)

481 GCG GCT ATC AAC CAC ACT TTT GGT TTG GAT TGG AGG CCC TAC TCT TGG TAT AGC TTA TTC  
 ala ala ile asn his thr phe gly leu asp trp arg pro tyr ser trp tyr ser leu phe  
 511

541 GTA GCG ATC AAC ACG ATT CCT GCT GCG ATT TTA TCC CAC TAT AGC GAT ATG CTT GAT GAC  
 val ala ile asn thr ile pro ala ala ile leu ser his tyr ser asp met leu asp asp  
 571

601 CAC AAA GTG TTA GGC ATC ACT GAA GGC GAT TGG TGG GCG ATC ATT TGG TTG GCT TGG GGT  
 his lys val leu gly ile thr glu gly asp trp trp ala ile ile trp leu ala trp gly  
 631

661 GTT TTG TGG CTT ACC GCT TTC ATT GAA AAC AAC ATC TTG AAA ATC CCT TTA GGG AAA TTC ACT  
 val leu trp leu thr ala phe ile glu asn ile leu lys ile pro leu gly lys phe thr  
 691

721 CCA TGG CTT GCT ATC ATT GAG GGC ATT TTA ACC GCT TGG ATC CCT GCT TGG TTA CTC TTT  
 pro trp leu ala ile ile glu gly ile leu thr ala trp ile pro ala trp leu leu phe  
 751

781 ATC CAA CAC TGG GTG TGA GAT GAT CAT  
 ile gln his trp val OPA  
 811

782 TCC AAC ACT GGG TGT GAG ATG ATC ATA GAG CGT TTA ATA GGC AAT CTA AGG GAT TTA AAC  
 ureE Met ile ile glu arg leu ile gly asn leu arg asp leu asn  
 812

# FIGURE 4 (cont)

842	CCC TTG GAT TTC AGC GTG GAT TAT GTG GAT TTG GAA TGG TTT GAA ACG AGG AAA AAA ATC	871	pro leu asp phe ser val asp tyr val asp leu glu trp phe glu thr arg lys lys ile
902	GCT CGC TTT AAA ACC AGG CAA GGC AAA GAC ATA GCC GTA CGC CTT AAA GAC GCT CCC AAG	932	ala arg phe lys thr arg gln gly lys asp ile ala val arg leu lys asp ala pro lys
962	TTG GGT TTC TCT CAA GGA GAT ATT TTA TTT AAA GAG AAG GAA ATT ATC GCC GTT AAT	992	leu gly phe ser gln gly asp ile leu phe lys glu lys glu ile ala val asn
1022	ATC TTG GAT TCT GAA GTC ATT CAC ATC CAA GCT AAG AGC GTG GCA GAA GTA GCG AAA ATA	1052	ile leu asp ser glu val ile his ile gln ala lys ser val ala glu val ala lys ile
1082	TGC TAT GAA ATA GGA AAC CGC CAT GCG GCT TTA TAC TAT GGC GAG TCT CAA TTT GAA TTT	1112	cys tyr glu ile gly asn arg his ala ala leu tyr gly glu ser gln phe glu phe
1142	AAA ACA CCA TTT GAA AAG CCC ACG CTA GCG TTA CTA GAA AAG CTA GGG GTT CAA AAT CGT	1172	lys thr pro phe glu lys pro thr leu ala leu leu glu lys leu gly val gln asn arg
1202	GTT TTA AGT TCA AAA TTG GAT TCC AAA GAA CGC TTA ACC GTG AGC ATG CCC CAT AGT GAG	1232	val leu ser ser lys leu asp ser lys glu arg leu thr val ser met pro his ser glu



## FIGURE 4 (suite)

1262	CCT AAT TTT AAG GTC TCA CTG GCG AGC GAT TTT AAA GTG GTC ATG AAA TAG AAA AAC AA	SD
	pro asn phe lys val ser leu ala ser asp phe lys val val met lys AMB	
1321	CAA ATG GAT AAA GGA AAA AGC GTG AAA AGC ATT GAA AAA AGC GTG GGT ATG CTC CCA AAA	1292
F	Met asp lys gly lys ser val lys ser ile glu lys ser val gly met leu pro lys	
1381	ACT CCA AAG ACA GAC AGC AAT GCT CAT GTG GAT AAT GAA TTT CTG ATT CTG CAA GTC AAT	1351
thr pro lys thr asp ser asn ala his val asp asn glu phe leu ile leu gln val asn		
1441	GAT GCG GTG TTC CCC ATT GGA TCT TAC ACG CAT TCT TTT GGG CTT TTG GCT AGA AAC TTA	1411
asp ala val phe pro ile gly ser tyr thr his ser phe gly leu leu ala arg asn leu		
1501	CAT CCA GCA AAA AAG GTT ACT AAT AAA GAA AGC GCT TTA AAA TAT TTA AAA GCC AAT CTC	1471
his pro ala lys lys val thr asn lys glu ser ala leu lys tyr leu lys ala asn leu		
1561	TCT AGC CAG TTC CTT TAC ACG GAA ATG CTG AGC TTG AAA CTC ACC TAT GAA AGC GCT CTC	1531
ser ser gln phe leu tyr thr glu met leu ser leu lys leu thr tyr glu ser ala leu		
1621	CAA CAA GAT TTA AAA AGG ATC TTA GGG GTT GAA GAA ATC ATT ACG CTA TCC ACA AGC CCC	1591
gln gln asp leu lys arg ile leu gly val glu glu ile thr leu ser thr ser pro		

Figure 4 (Suite)

1681  
 ATG GAA TTG CGA TTA GCC AAT CAA AAG CTA GGC AAT CGT TTC ATT AAA ACC TTA CAA GCC  
 met glu leu arg leu ala asn gln lys leu gly asn arg phe ile lys thr leu gln ala

1711  
 1741  
 ATG AAC GAA TTA GAC ATT GGC GCA TTT TTT AAC GCT TAC GCT CAA CAA ACC GAA GAC CCC  
 met asn glu leu asp ile gly ala phe phe asn ala tyr ala gln gln thr glu asp pro

1771  
 1801  
 ACC CAT GCC ACT AGC TAT GGC GTT TTT GCG GCG AGT TTG GGG ATT GAA TTG AAA AAG GCT  
 thr his ala thr ser tyr gly val phe ala ala ser leu gly ile glu leu lys lys ala

1831  
 1861  
 TTA AGG CAT TAT CTT TAT GCA CAA ACT TCT AAC ATG GTA ATT AAC TGC GTT AAA AGC GTC  
 leu arg his tyr leu tyr ala gln thr ser asn met val ile asn cys val lys ser val

1891  
 1921  
 CCA CTA TCT CAA AAC GAT GAT GGC CAA AAA ATC TTA TTG AGC TTG CAA AGC CCT TTT AAC CAG  
 pro leu ser gln asn asp gly gln lys ile leu ser leu gln ser pro phe asn gln

1951  
 2011  
 CTC ATA GAA AAA ACC CTA GAA CTA GAC GAA AGC CAC TTG TGC GCG GCA AGC GTT CAA AAC  
 leu ile glu lys thr leu glu leu asp glu ser his leu cys ala ala ser val gln asn

2071  
 2041  
 GAC ATT AAG GCG ATG CAG CAT GAG AGT TTA TAC TCG CGC CTT TAT ATG TCT TGA ATT TTA  
 asp ile lys ala met gln his glu ser leu tyr ser arg leu tyr met ser OPA

9/20

Figure 4 (suite)

2102 SD 2132  
 TCT CAA ATT GAA AGG AAT TTT ATG GTA AAA ATT GGA GTT TGT GGT CCT GTA GGA AGC GGT  
ureG Met val lys ile gly val cys gly pro val gly ser gly  
 2162 2192  
 AAA ACC GCC TTG ATT GAA GCT TTA ACG CGC CAC ATG TCA AAA GAT TAT GAC ATG GCG GTC  
lys thr ala leu ile glu ala leu thr arg his met ser lys asp tyr asp met ala val

2222 2252  
 ATC ACT AAT GAT ATT TAC ACG AAA GAA GAC GCA GAA TTT ATG TGT AAA AAT TCG GTG ATG  
 ile thr asn asp ile tyr thr lys glu asp ala glu phe met cys lys asn ser val met

2282 2312  
 CCA CGA GAG AGG ATC ATT GGC GTA GAA ACA GGA GGC TGT CCG CAC ACG GCT ATT AGA GAA  
 pro arg glu arg ile ile gly val glu thr gly gly cys pro his thr ala ile arg glu

2342 2372  
 GAC GCT TCT ATG AAT TTA GAA GCC GTA GAA GAA ATG CAT GGC CGT TTC CCT AAT TTG GAA  
 asp ala ser met asn leu glu ala val glu glu met his gly arg phe pro asn leu glu

2402 2432  
 TTG CTT TTG ATT GAA AGC GGA GGC AGT AAC CTT TCA GCG ACT TTC AAC CCA GAG CTA GCG  
 leu leu leu ile glu ser gly gly ser asn leu ser ala thr phe asn pro glu leu ala

2462 2492  
 GAC TTT ACG ATC TTT GTG ATT GAT GTG GCT GAG GGC GAT AAA ATC CCC AGA AAA GGC GGG  
 asp phe thr ile phe val ile asp val ala glu gly asp lys ile pro arg lys gly gly

# Figure 4 (suite)

2522 CCA GGA ATC ACG CGT TCA GAC TTG CTT GTC ATC AAT AAG ATT GAT TTA GCC CCC TAT GTG  
pro gly ile thr arg ser asp leu leu val ile asn lys ile asp leu ala pro tyr val

2552

2582 GGA GCC GAC TTG AAA GTC ATG GAA AGG GAT TCT AAA AAA ATC GCG GCG AAA AGC CCT TTA  
gly ala asp leu lys val met glu arg asp ser lys lys ile ala ala lys ser pro leu

2612

2642 TTT TTA CCG AAT ATC CGC GCT AAA GAA GGT TTA GAC GAT GTG ATC GCT TGG ATC AAG CGC  
phe leu pro asn ile arg ala lys glu gly leu asp asp val ile ala trp ile lys arg

2672

2702 AAC GCT TTA TTG GAA GAT TGA TGA ACA CTT  
asn ala leu leu glu asp OPA

2731

2701 CAA CGC TTT ATT GGA AGA TTG ATG AAC ACT TAC GCT CAA GAA TCC AAG CTC AGG TTA AAA  
ureH Met asn thr tyr ala gln glu ser lys leu arg leu lys

2791

2761 ACC AAA ATA GGG GCT GAC GGG CGG TGC GTG ATT GAA GAC AAT TTT TTC ACG CCC CCC TTT  
thr lys ile gly ala asp gly arg cys val ile glu asp asn phe phe thr pro pro phe

2851

2821 AAG CTC ATG GCG CCC TTT TAC CCT AAA GAC GAT TTA GCG GAA ATC ATG CTT TTA GCG GTA  
lys leu met ala pro phe tyr pro lys asp asp leu ala glu ile met leu leu ala val

11/20

Figure 4 (suite)

2881 AGC CCT GGC TTA ATG AAA GGC GAT GCA CAA GAT GTG CAA TTG AAC ATC GGT CCA AAT TGC  
 ser pro gly leu met lys gly asp ala gln asp val gln leu asn ile gly pro asn cys

2941 AAG TTA AGG ATC ACT TCG CAA TCC TTT GAA AAA ATC CAT AAC ACT GAA GAC GGG TTT GCT  
 lys leu arg ile thr ser gln ser phe glu lys ile his asn thr glu asp gly phe ala

3001 AGC AGA GAC ATG ATC ATC GTT GTG GGG GAA AAC GCT TTT TTA GAC TTC GCG CCC TTC CCG  
 ser arg asp met his ile val val gly glu asn ala phe leu asp phe ala pro phe pro

3061 TTA ATC CCC TTT GAA AAC GCG CAT TTT AAG GGC AAT ACC ACG ATT TCT TTG CGC TCT AGC  
 leu ile pro phe glu asn ala his phe lys gly asn thr thr ile ser leu arg ser ser

3121 TCC CAA TTG CTC TAT AGT GAA ATC ATC ATT GTC GCA GGG CGA GTG GCG CGC AAT GAG TTG TTT  
 ser gln leu leu tyr ser glu ile ile val ala gly arg val ala arg asn glu leu phe

3181 AAA TTC AAC CGC TTG CAC ACC AAA ATC TCT ATT TTA CAA GAT GAG AAA CCC ATC TAT TAT  
 lys phe asn arg leu his thr lys ile ser ile leu gln asp glu lys pro ile tyr tyr

3241 GAC AAC ACG ATT TTA GAT CCC AAA ACC ACC GAC TTA AAT AAC ATG TGC ATG TTT GAT GGC  
 asp asn thr ile leu asp pro lys thr thr asp leu asn asn met cys met phe asp gly

Figure 4 (Suite)

3301 TAT ACG CAT TAT TTG AAT TTG GTG CTG GTC AAT TGC CCC ATA GAG CTG TCT GGC GTG CGA  
 tyr thr his tyr leu asn leu val leu val asn cys pro ile glu leu ser gly val arg  
 3331  
 3361 GGA TTG ATT GAA GAG AGC GAA GGA GTG GAT GGA GCC GTG AGT GAA ATC GCT AGT TCT CAT  
 gly leu ile glu ser glu gly val asp gly ala val ser glu ile ala ser ser his  
 3391  
 3421 TTA TGC CTG AAA GCT TTA GCG AAA GGC TCA GAA CCC TTG TTG CAT TTA AGA GAA AAA ATC  
 leu cys leu lys ala leu ala lys gly ser glu pro leu leu his leu arg glu lys ile  
 3451  
 3481 GCT CGC TTT ATC ACG CAA ACG ATT ACG CCA AAG GTT TAA AAA ACA CTT TAA AAA AGA TTA  
 ala arg phe ile thr gln thr ile thr pro lys val OCH  
 3511  
 3541 TAC CCT TTA GTC TTT TTT AA  
 ←  
 ←

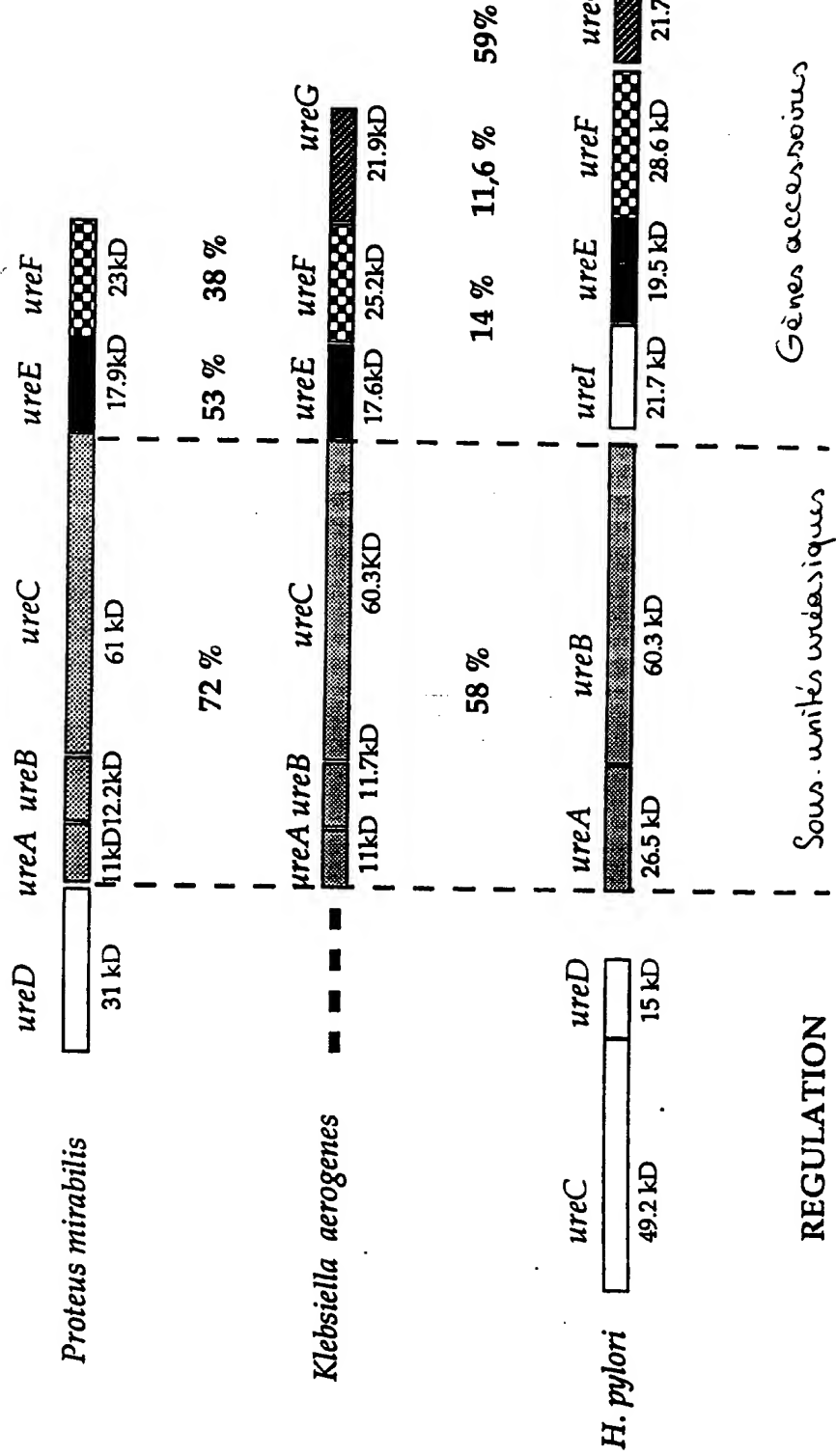


FIGURE 5

14/20

Sondes :

A

BamHI

HindIII

Figure 6

B

BamHI

HindIII

0.65

1.3  
1.2

↑

↑

0.7

1.35  
1.25  
1.15

1.55

1.9

2.5

3.5

3.5

4.1

5.1

6.25

6.25

N6::TnKm-3

N6::TnKm-4

N6

N6::TnKm-3

N6::TnKm-4

N6

Kilobases

N6::TnKm-3

N6

N6::TnKm-4

85P

N6::TnKm-3

N6

N6::TnKm-4

85P

Kilobases



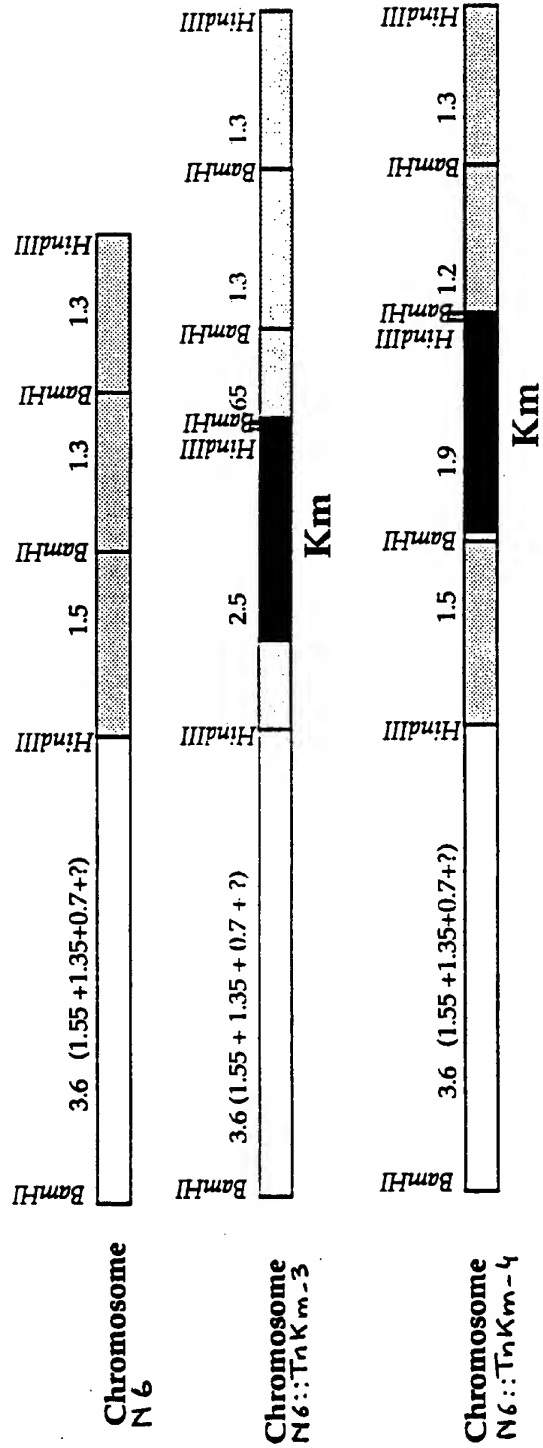
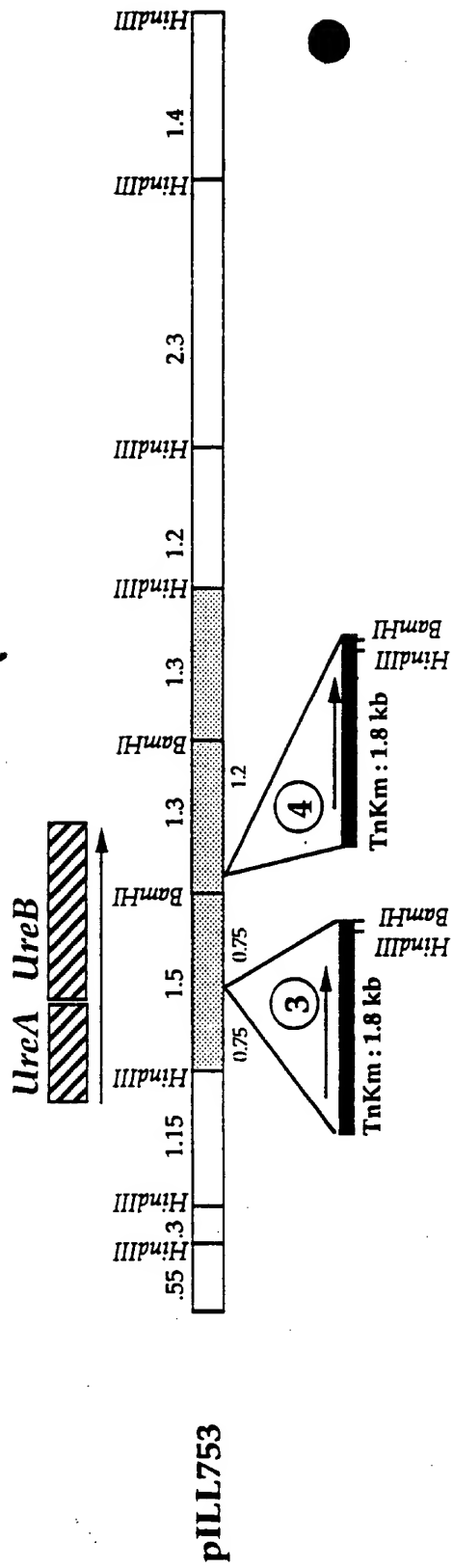


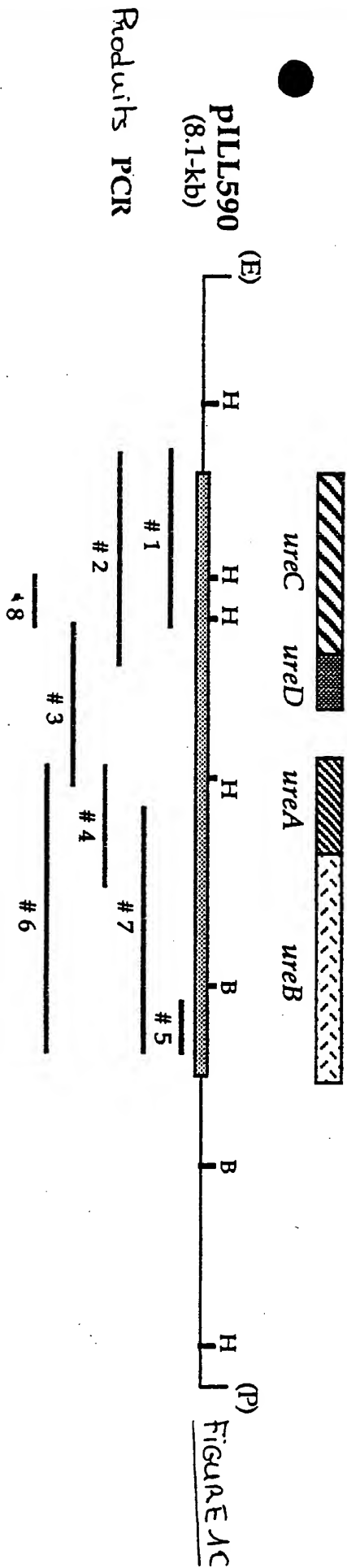
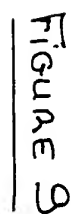
FIGURE 7

16/20

1: isolat 85P  
2: isolat N6  
3: isolat N6::TnKm

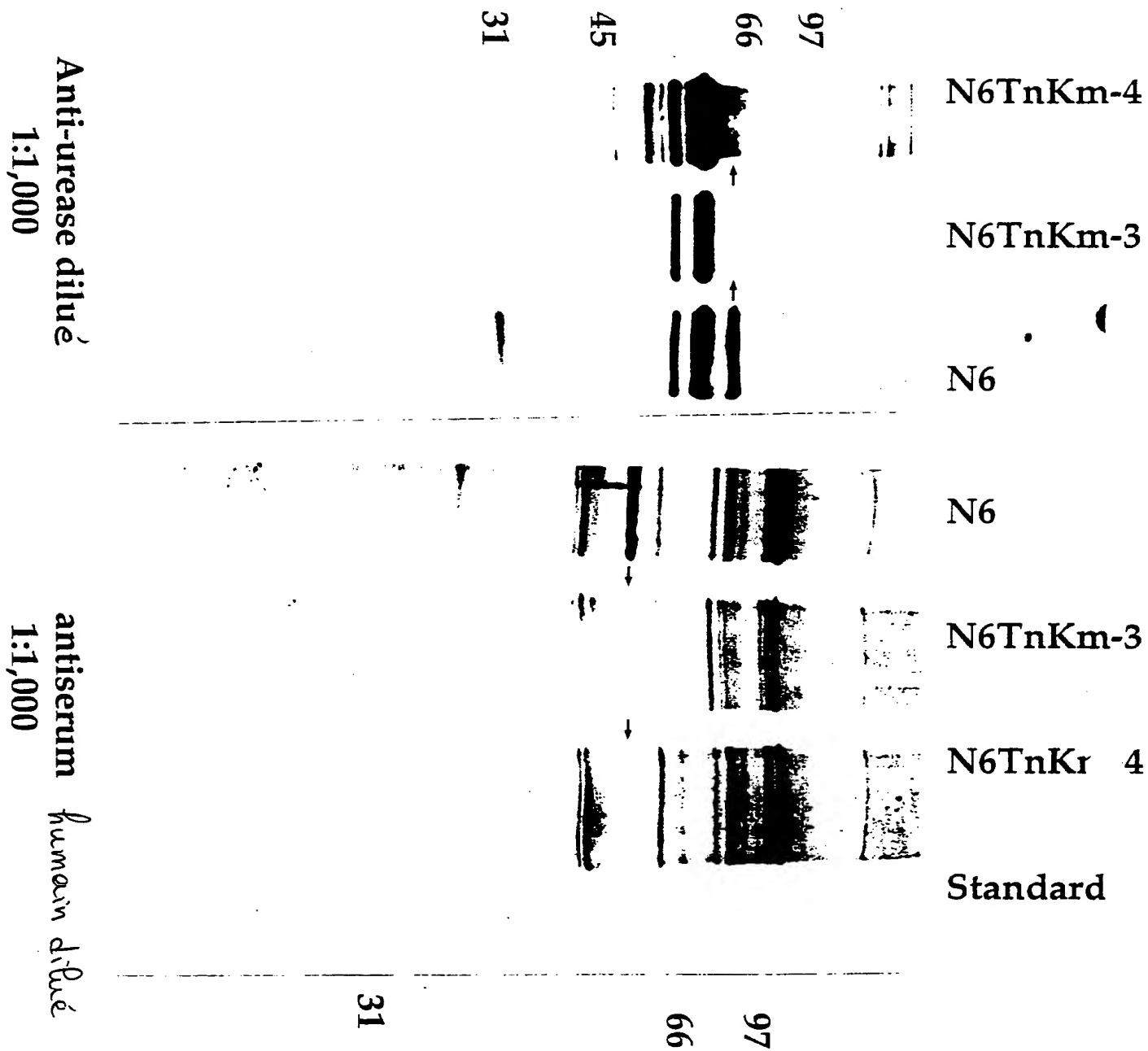
3 2 1



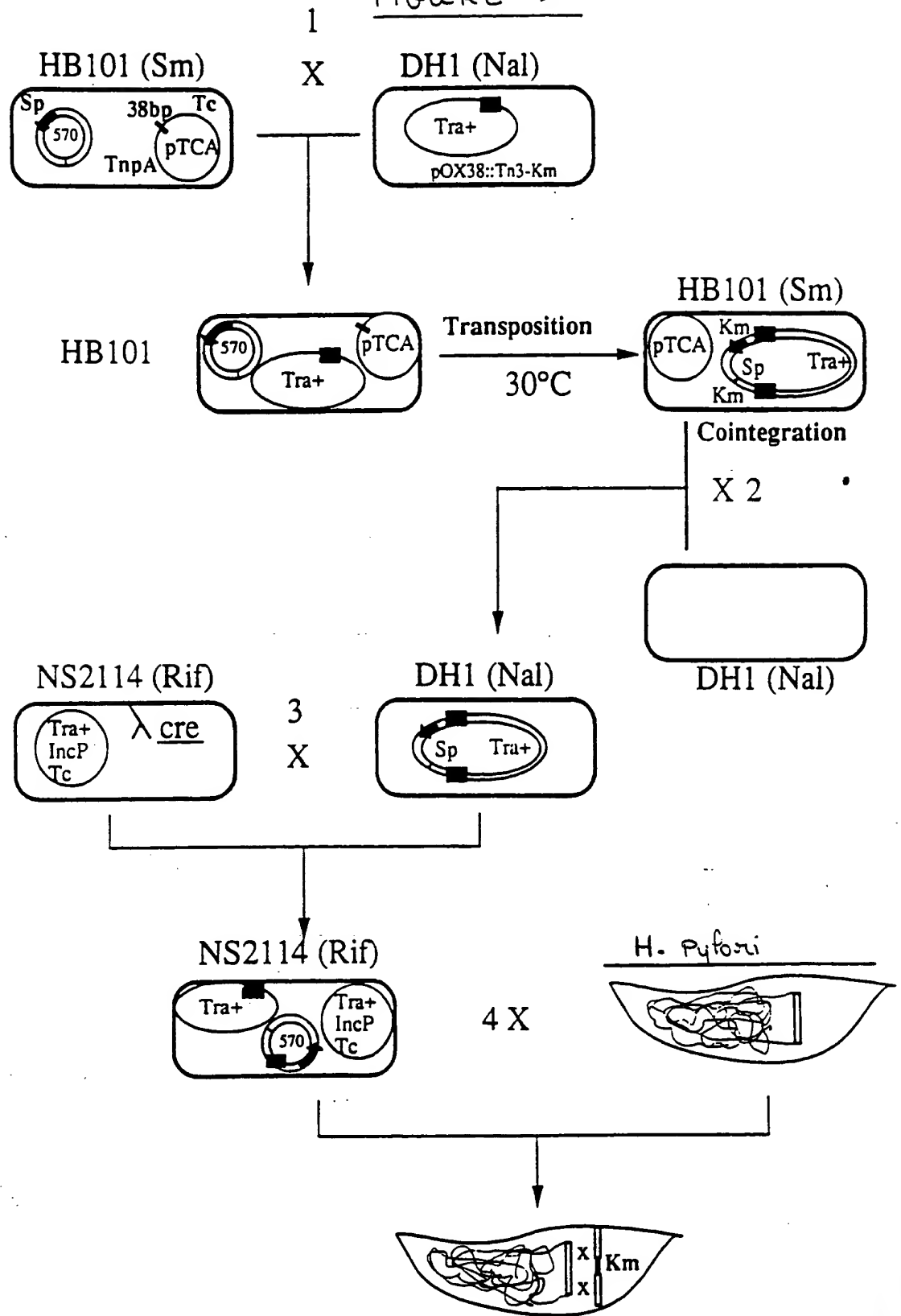


18120

Figure 11



19/20  
FIGURE 12



20/20

FIGURE 13

